



**CLÁUDIA MARIA  
CARRUDO DE  
DEUS**

**RESVERATROL E CANCRO – QUAL O PAPEL PARA  
AS SIRTUINAS?**

**RESVERATROL AND CANCER – WHAT ROLE FOR  
SIRTUINS?**



**CLÁUDIA MARIA  
CARRUDO DE  
DEUS**

**RESVERATROL E CANCRO – QUAL O PAPEL PARA  
AS SIRTUINAS?**

**RESVERATROL AND CANCER – WHAT ROLE FOR  
SIRTUINS?**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada no ramo de Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Doutor Paulo Jorge Gouveia Simões da Silva Oliveira, investigador do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra e coorientação da Doutora Susana Maria de Almeida Cardoso, investigadora do CERNAS - Centro de Estudos e Recursos Naturais, Ambiente e Sociedade e da Professora Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos, Professora Associada com Agregação da Universidade de Aveiro.

Apoio Financeiro da Fundação para a  
Ciência e a Tecnologia (projeto  
PTDC/SAU-TOX/110952/2009), co-  
financiado por FEDER/COMPETE e  
orçamento de Estado

*Aos meus pais, irmã e André*

«Entre o sono e sonho,  
Entre mim e o que em mim  
É o quem eu me suponho  
Corre um rio sem fim.  
Passou por outras margens,  
Diversas mais além,  
Naquelas várias viagens  
Que todo o rio tem.  
Chegou onde hoje habito  
A casa que hoje sou.  
Passa, se eu me medito;  
Se desperto, passou.

E quem me sinto e morre  
No que me liga a mim  
Dorme onde o rio corre -  
Esse rio sem fim.»

*Fernando Pessoa*

## **o júri**

Presidente

**Professora Doutora Adelaide Pinho Almeida**  
professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Arguente Principal

**Doutor José Miguel Pimenta Ferreira de Oliveira**  
investigador de Pós-Doutoramento do CESAM – Centro de Estudos do Ambiente e do Mar e do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Orientador

**Doutor Paulo Jorge Gouveia Simões da Silva Oliveira**  
investigador auxiliar do CNC – Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade da Coimbra

Co-Orientadora

**Doutora Susana Maria de Almeida Cardoso**  
investigadora auxiliar do CERNAS – Centro de Estudos e Recursos Naturais, Ambiente e Sociedade

Co-Orientadora

**Professora Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos**  
professora associada com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

A execução deste trabalho não teria sido possível sem a ajuda incondicional de um conjunto de pessoas e entidades que de qualquer forma contribuíram para a realização do mesmo. Quero começar por agradecer à Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia, por ter financiado este projeto.

À Professora Doutora Conceição Santos pelos seus ensinamentos e disponibilidade ao longo da realização deste trabalho.

Ao Doutor Paulo Oliveira, por ter aceitado a minha colaboração neste projeto, por toda a sua disponibilidade, amizade, críticas, sugestões, ensinamentos, correções finais e orientação prestada.

À Doutora Susana Cardoso, pela ajuda inicial na integração neste projeto, pela sua disponibilidade, compreensão, paciência e amizade que demonstrou ao longo da realização do mesmo, bem como na contribuição na correção e sugestões do trabalho.

A todos os meus colegas do Grupo de Metabolismo Energético em Doenças Cardiovasculares e Cancro pela relação científica e não científica que sempre demonstraram e que me ajudou a evoluir. Especialmente à Doutora Teresa Serafim pela atenção, compreensão, companheirismo e pela sua capacidade em transmitir conhecimento.

Aos meus pais e irmã, num sem fim de textos quero reconhecer a sua compreensão, carinho e entusiasmo que me transmitiram e que foram indispensáveis para chegar até aqui.

Ao meu namorado, pelo companheirismo, amizade e amor demonstrado que tanto me ajudou nesta caminhada, pelas inúmeras trocas de impressões e comentários ao trabalho.

Aos colegas de mestrado pela excelente relação pessoal que criámos e que espero que não se perca, e a todos os amigos, que de uma ou de outra maneira me acompanharam ao longo de mais uma caminhada.

A todos, o meu muito obrigado.

## palavras-chave

Cancro, resveratrol, sirtuinas, quimioprotetores, linhas celulares, citotoxicidade

## resumo

O cancro é uma doença com elevada incidência em todo o mundo. O processo de carcinogénese é bastante complexo e envolve uma série de transformações que culminam no desenvolvimento tumoral. É por isso necessário encontrar novas terapias que sejam menos agressivas ou que aumentem a eficiência da quimioterapia no combate ao cancro. Os polifenóis, nomeadamente o resveratrol têm sido apontados como compostos com efeitos quimioprotetores e citotóxicos em vários tipos de cancro, prevenindo e atrasando o desenvolvimento tumoral nos vários estágios do processo carcinogénico. Apesar de ainda não serem totalmente conhecidos os mecanismos pelos quais este composto atua nas células, a sua atividade parece estimular a atividade de sirtuinas. Uma vez que estas desacetilases desempenham um papel fundamental na regulação de vários mecanismos na resposta ao stresse, parecem estar relacionadas com a regulação do desenvolvimento tumoral. O objetivo deste trabalho foi determinar se a diferente ação citotóxica do resveratrol em várias linhas celulares tumorais está relacionada com uma diferente quantidade basal e posterior alteração do conteúdo de sirtuina 1 e sirtuina 3. Os resultados obtidos através do ensaio de avaliação da proliferação celular mostraram que uma concentração de 50  $\mu\text{M}$  de resveratrol provocou uma diminuição do número de células em todas as linhas celulares. Através de microscopia de epifluorescência foi possível observar que este composto provoca alterações morfológicas celulares e na rede mitocondrial de linhas celulares tumorais, sugerindo a morte celular por apoptose. A análise do conteúdo proteico em sirtuina 1 e sirtuina 3 nas células após tratamento com resveratrol mostrou que de uma forma geral a quantidade de sirtuina 1 é aumentada em todas as linhas celulares, embora sem significância estatística. E que apesar de também sem significância estatística, o resveratrol parece aumentar a quantidade da sirtuina 3 em algumas das linhas estudadas, nomeadamente nas MCF-7. Desta forma, sugere-se que existe alguma correlação entre a expressão das sirtuinas e o efeito do resveratrol na inibição do crescimento de linhas celulares tumorais. Se trabalhos futuros completarem e confirmarem os resultados aqui obtidos, o resveratrol poderá assim ser considerado um bom aliado no desenvolvimento de novas terapêuticas no combate a vários tipos de cancro.

**keywords**

Cancer, resveratrol, sirtuins, chemoprotectives, cell lines, cytotoxicity

**abstract**

Cancer is a disease with high prevalence in the world. The process of carcinogenesis is complex and involves a series of transformations that culminate in tumor development. It is therefore necessary to find new therapies that are less aggressive or which increase the efficacy of chemotherapy in fighting cancer. Polyphenols, namely in particular resveratrol, have been identified as chemopreventive or cytotoxic agents against various types of cancer, preventing and delaying the tumor growth at various stages of the carcinogenic process. Although the mechanisms by which resveratrol acts on cells are not fully known, its activity seems to stimulate the activity of sirtuins. Since these deacetylases play a major role in the regulation of various mechanisms in response to stress, their activity may be related with the regulation of tumor development. The objective of this study was to determine whether different cytotoxic actions of resveratrol on several tumor cell lines is related to a different basal content and subsequent modulation of sirtuin 1 and sirtuin 3. The results obtained from cell proliferation assays showed that 50  $\mu$ M of resveratrol resulted in a decrease in cell number in all cell lines tested. By means of epifluorescence microscopy it was observed that resveratrol leads to morphological changes in cellular and mitochondrial network of tumor cell lines, which is suggestive of apoptotic cell death. The semi-quantification of sirtuin 1 and sirtuin 3 protein content after resveratrol treatment showed that in general the amount of sirtuin 1 is increased in all cell lines, although not statistically significant. Although not statistically significant, resveratrol seems to increase the amount of sirtuin 3 in some of the cell lines studied, particularly in MCF-7. Although preliminary, the results suggest that there is some correlation between the expression of sirtuins and the effect of resveratrol on growth inhibition of tumor cell lines. If future results complement and confirm this data, resveratrol may thus be considered a good ally in the development of new therapeutics to combat various types of cancer.



## Índice

Lista de Abreviaturas.....	ix
Lista de Figuras .....	xii
Lista de Tabelas .....	xiv
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	1
1.1.    Cancro.....	2
1.2.    Resveratrol .....	5
1.2.1. Biodisponibilidade e farmacologia .....	6
1.2.2. Ação anti-tumoral.....	7
1.3.    Sirtuinas .....	9
1.3.1. Atividade Enzimática .....	10
1.4.    Mitocôndria e morte celular.....	13
1.4.1. Mitocôndria: Estrutura e função.....	14
1.4.2. Morte Celular .....	18
CAPÍTULO 2: HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	23
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1.    Reagentes e compostos químicos utilizados .....	26
3.2.    Linhagens Celulares.....	26
3.3.    Cultura de Células.....	27
3.4.    Ensaio da Proliferação celular .....	27
3.5.    Microscopia de Epifluorescência.....	28
3.6.    Western Blot .....	28
3.6.1. Condições de cultura das células.....	28
3.6.2. Recolha de extratos totais das células .....	29
3.6.3. Anticorpos utilizados.....	29
3.6.4. Procedimento do Western Blot .....	30
3.7.    Análise Estatística.....	30
CAPÍTULO 4: RESULTADOS .....	31
4.1.    Efeitos citotóxicos do resveratrol.....	32
4.2.    Avaliação da morte celular induzida pelo resveratrol .....	34
4.3.    Níveis de expressão da SIRT1 e da SIRT3 nas linhas celulares estudadas.....	40
4.4.    Alterações nos níveis de expressão da SIRT1 e da SIRT3 pelo resveratrol .....	41

CAPÍTULO 5: DISCUSSÃO .....	47
CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS .....	55
CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57

## Lista de Abreviaturas

<b>Acetil-CoA</b>	Acetil coezima A
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>Apaf-1</b>	Fator de ativação de proteases apoptóticas 1
<b>APS</b>	Persulfato de amónia
<b>ATM</b>	Ataxia telangiectasia mutata
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>Bcl-2</b>	Linfoma de células B 2
<b>Bcl-XL</b>	Linfoma de células B extra largo
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de cálcio
<b>CO</b>	Citocromo c oxidase
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>COX1</b>	Ciclooxigenase 1
<b>CTBP</b>	Proteína de ligação ao terminal Carboxílico
<b>DIABLO</b>	Proteína de ligação direta à proteína de inibição da apoptose
<b>DISC</b>	Complexo de sinalização que induz a morte
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified Eagle's</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiaminotetracético
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidérmico
<b>ER</b>	Recetor de estrogénio
<b>ERKs</b>	Proteínas cinases reguladas por sinais extracelulares
<b>ETC</b>	Cadeia transportadora de eletrões
<b>FADD</b>	Proteína de domínio de morte Fas associada
<b>FOXO</b>	Proteínas <i>forkhead box</i>
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogénio
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico

<b>HEPES</b>	Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazina etanossulfónico
<b>HtrA2</b>	Temperatura elevada necessária para a proteína A2
<b>IMDM</b>	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
<b>JNKs</b>	Cinases com um terminal N e c-Jun
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de potássio monobásico
<b>MAPK</b>	Proteína cinase que ativa mitógenos
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>miRNA</b>	micro-RNA
<b>MPT</b>	Permeabilidade transitória mitocondrial
<b>mtDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de sódio
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NADH</b>	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
<b>NADPH</b>	Fosfato dinucleótido adenina nicotinamida
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato monossódico
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Hidrogenocarbonato de sódio
<b>NAM</b>	Nicotinamida
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>ND</b>	NADH desidrogenase
<b>NF-kB</b>	Fator nuclear kB
<b>O<sup>•</sup>H</b>	Radical hidroxilo
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Anião superóxido
<b>OAA</b>	Oxaloacetato
<b>Omi</b>	Endoprotease que regula o stresse de proteases localizadas na mitocôndria
<b>OXPHOS</b>	Fosforilação oxidativa
<b>PDH</b>	Piruvato desidrogenase
<b>PEP</b>	Fosfoenolpiruvato
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	Co-ativador 1-alfa do recetor ativado da proliferação de peroxissoma
<b>PK</b>	Piruvato cinase
<b>PMSF</b>	Fluoreto fenilmetilsulfonil

<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Recetor ativado da proliferação de peroxissoma co-ativador 1-gama
<b>PVDF</b>	Fluoreto de polivinilideno
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigénio
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribossomal
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>Sir2</b>	Regulador de informação silenciada 2
<b>SIRT</b>	Sirtuina
<b>Smac</b>	Segundo Ativador mitocondrial de caspases
<b>SRB</b>	Sulforodamina B
<b>TAP</b>	Promotor de tumor
<b>TCA</b>	Ácido tricarbóxico
<b>TEMED</b>	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametiletilenodiamina
<b>TMRM</b>	Éster metílico de tetrametilrodamina
<b>TNFR2</b>	Recetor do fator de necrose tumoral 2
<b>TRAIL</b>	Ligando que induz a apoptose relacionado com o TNF
<b>tRNA</b>	Ácido ribonucleico de transferência
<b>UCP-1</b>	Proteína desacopladora 1

## Lista de Figuras

- Figura 1** Representação esquemática das alterações metabólicas durante o desenvolvimento de um tumor
- Figura 2** Estrutura química do resveratrol, nas duas formas. **A:** *Trans*-resveratrol; **B:** *Cis*-resveratrol.
- Figura 3** Representação esquemática da indução da apoptose e inibição do crescimento celular pelo resveratrol.
- Figura 4** Representação dos dois tipos de reações enzimáticas catalisadas pelas sirtuínas. **A:** Reação de desacetilação; **B:** Reação de ribosilação do ADP de proteínas.
- Figura 5** **A:** Representação esquemática da mitocôndria; **B:** Mapa do mtDNA de mamíferos.
- Figura 6** Representação do ciclo do TCA na mitocôndria.
- Figura 7** Representação esquemática da cadeia transportadora de elétrons.
- Figura 8** As duas principais vias da Apoptose. **A:** Via extrínseca da apoptose; **B:** Via intrínseca da apoptose.
- Figura 9** Efeitos do resveratrol na proliferação celular de células não tumorais (**A:** H9c2) e tumorais (**B:** MDAMB-231; **C:** MCF-7; **D:** A549).
- Figura 10** Imagens de Microscopia de Epifluorescência mostram os efeitos do resveratrol na morfologia celular e na rede mitocondrial na linha celular não tumoral (H9c2).
- Figura 11** Imagens de Microscopia de Epifluorescência mostram os efeitos do resveratrol na morfologia celular e na rede mitocondrial na linha celular tumoral (MDA-MB-231).
- Figura 12** Imagens de Microscopia de Epifluorescência mostram os efeitos do resveratrol na morfologia celular e na rede mitocondrial na linha celular tumoral (MCF-7).
- Figura 13** Imagens de Microscopia de Epifluorescência mostram os efeitos do resveratrol na morfologia celular e na rede mitocondrial na linha celular tumoral (A549).
- Figura 14** Alterações na intensidade de fluorescência induzidas pelo resveratrol.  
Detecção por Western Blotting do conteúdo em SIRT1 e SIRT3 em extratos totais

- Figura 15** (A); Representação gráfica da quantificação das bandas obtidas por Western Blotting para SIRT1 (B) e SIRT3 (C).
- Figura 16** A: Detecção por Western Blotting dos níveis de expressão de SIRT1 e SIRT3 em extratos totais; B: Representação gráfica da quantificação das bandas obtidas por Western Blotting em glucose (1) e galactose (2).
- Figura 17** A: Detecção por Western Blotting dos níveis de expressão de SIRT1 e SIRT3 em extratos totais; B: Representação gráfica da quantificação das bandas obtidas por Western Blotting em glucose (1) e galactose (2).
- Figura 18** A: Detecção por Western Blotting dos níveis de expressão de SIRT1 e SIRT3 em extratos totais; B: Representação gráfica da quantificação das bandas obtidas por Western Blotting em glucose (1) e galactose (2).
- Figura 19** A: Detecção por Western Blotting dos níveis de expressão de SIRT1 e SIRT3 em extratos totais; B: Representação gráfica da quantificação das bandas obtidas por Western Blotting em glucose (1) e galactose (2).
- Figura 20** Representação esquemática da via metabólica da galactose.

## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1**      Sirtuinas de mamíferos



# CAPÍTULO 1

---

## INTRODUÇÃO

### 1.1. Cancro

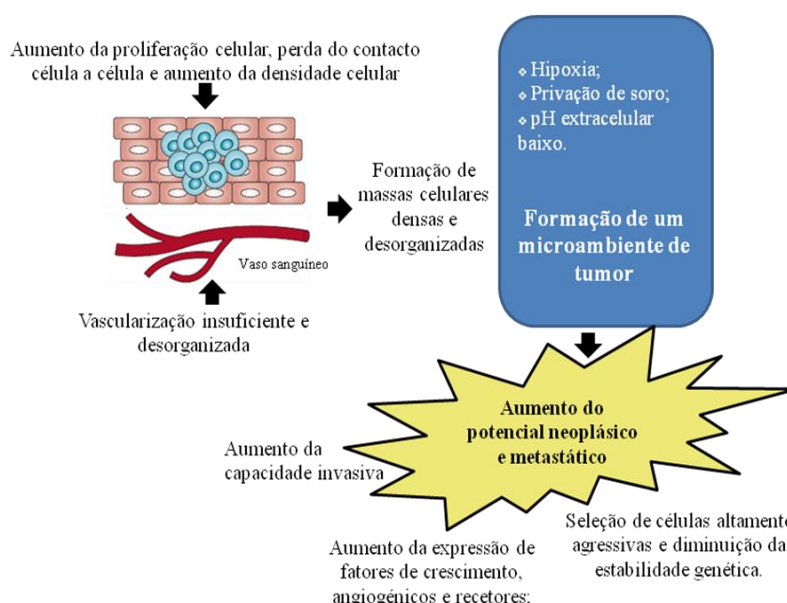
De meados do século XIX até à primeira metade do século XX, o cancro era visto como uma população de células normais que cresciam de forma descontrolada. No entanto, com os avanços na investigação científica, sabe-se hoje que a carcinogénese é um processo complexo onde ocorrem diversas alterações, tanto ao nível do crescimento celular como na expressão de genes (Hanahan e Weinberg 2000; Dong 2003). As células cancerígenas apresentam várias características de índole adaptativa, nomeadamente autossuficiência em sinais de crescimento celular, insensibilidade para sinais de inibição do crescimento, evasão da apoptose e da destruição imune, aumento da capacidade de replicação, angiogénese sustentada, invasão de tecidos, metástases e reprogramação do metabolismo energético, o que lhes permite crescer de forma descontrolada em ambientes adversos (Hanahan e Weinberg 2000; Gogvadze et al. 2009; Webb et al. 2011).

Os carcinogénicos químicos podem atuar por mutações na modulação ou na indução de genes que controlam o crescimento normal e consequentemente a proliferação de células cancerígenas (Dong 2003). O cancro pode advir de todos os tipos de células do corpo humano, incluindo tecidos mesenquimais, hematopoiético, neuro-ectodérmico, embora os mais comuns sejam os de origem epitelial, designados de carcinomas. Os carcinomas podem ser classificados em adenocarcinomas (células especializadas que secretam substâncias dentro de ductos ou cavidades) ou carcinomas de células escamosas (decorrentes de epitélios que formam células de proteção em camadas) (Hanahan e Weinberg 2000). As células não são consideradas apenas como células normais ou células malignas, existindo vários estádios intermediários. As células normais de diversos tecidos têm mecanismos controlados de homeostase, contribuindo para a sobrevivência do organismo. Embora possam existir exceções, a maioria dos tumores crescem geralmente mais rapidamente do que as células consideradas normais (Weinberg et al. 2010). As células cancerígenas invadem e colonizam os tecidos circundantes, formando um microambiente favorável ao seu desenvolvimento (Figura 1). Quando uma célula é encontrada em locais que diferem da sua origem, substituindo uma camada de células normais, denomina-se de metaplasia. Alternativamente, quando os tumores formam novos tipos de tecidos, sejam eles de natureza benigna ou maligna, denomina-se de neoplasia. (Fearon 1997; Stappenberg e Miyoshi 2009). A transformação celular é resultado de lesões

oncogénicas em conjunto com a inibição de supressores de tumor, a qual é ativada por fatores genéticos e mutações epigenéticas (Hanahan e Weinberg 2000).

Ao longo dos anos, vários autores têm demonstrado que os tumores alteram os perfis metabólicos e possuem a capacidade de captar elevadas quantidades de glucose. Embora estas alterações metabólicas não sejam os principais fatores para desencadear carcinogénese, estes podem contribuir para o desenvolvimento da mesma, uma vez que permitem que as células sobrevivam e invadam outros tecidos. Assim sendo, são várias as alterações que podem afetar diretamente a formação de tumores, tais como alterações na glicólise, na resposta celular à hipoxia e na capacidade de as células tumorais recrutarem novos vasos sanguíneos (Dang e Semenza 1999).

Uma das alterações metabólicas mais descritas em células cancerígenas é o aumento da glicólise aeróbica (ou efeito de Warburg) (Pelicano et al. 2006). A adenosina trifosfato (ATP) é produzida através da degradação não oxidativa de glucose em ácido láctico, permitindo a conversão dos metabolitos em precursores biossintéticos, ocorrendo mesmo na presença de oxigénio (Webb et al. 2011). Warburg (1930) sugeriu inicialmente que a glicólise aeróbica em tumores poderia refletir defeitos na respiração mitocondrial. Mais recentemente Gatenby e Gillies (2004) propuseram que células neoplásicas utilizam inicialmente a glicólise para a produção de energia devido à ocorrência de um microambiente hipóxico (Figura 1). Esta adaptação metabólica precoce parece oferecer uma vantagem proliferativa, suprimindo a apoptose. Além disso, os resultados da glicólise, isto é, a produção de lactato e possível acidose, contribuem para a degradação da matriz extracelular, facilitando a mobilidade das células e o aumento do potencial metastático (Gatenby e Gillies 2004). Consequentemente estas células invadem os vasos sanguíneos e o sistema linfático e deslocam-se de uns órgãos para os outros estabelecendo tumores secundários em vários órgãos (Hughes et al. 2008). As células com capacidade de metástase são as mais invasivas, sendo que 90% da morte por cancro é devida a metástases de tumores malignos (Hanahan e Weinberg 2000).



**Figura 1: Representação esquemática das alterações metabólicas durante o desenvolvimento de um tumor.** O aumento da proliferação e da densidade celular em tumores, juntamente com a perda de contato célula a célula e da adesão celular, afetam a vascularização do tumor produzindo um microambiente metabólico do tumor. Esse microambiente é caracterizado por baixos níveis de soro, hipóxia e um pH extracelular ácido, impulsionando a progressão tumoral e o fenótipo metastático. Adaptado de Cardone et al. (2005).

Também o stresse oxidativo está fortemente associado à patogénese do envelhecimento e ao desenvolvimento de diversas doenças, nomeadamente ao cancro (Dietrich e Horvath 2010; Fatehi-Hassanabad et al. 2010). A condição biológica clássica de stresse oxidativo estabelece-se quando ocorre um excesso de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês “*Reactive Oxygen Species*”), que não é contrabalançado pelas defesas antioxidantes (Smoliga et al. 2011). Este excesso de ROS pode ocorrer devido à fuga de eletrões da cadeia transportadora de eletrões (ETC, do inglês “*Electron Transport Chain*”), sendo o oxigénio o aceitador final desses eletrões. Este processo origina a formação do anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), sendo que subsequentemente poderá levar à formação de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e do radical hidroxilo ( $O^{\cdot}H$ ). Estes compostos, quando presentes em altas concentrações na célula, desencadeiam efeitos destrutivos (Sedensky e Morgan 2006).

Outros dos fatores que contribuem fortemente para a incidência de cancro são a hereditariedade, o ambiente e o estilo de vida (alimentação, hábitos reprodutivos, qualidade da água e ar) (Hanahan e Weinberg 2000). A população humana pode carregar características como “alelos de suscetibilidade” de diferentes frequências, no entanto o ambiente em que as pessoas vivem pode contribuir para o aparecimento de cancro. Um exemplo deste facto é a maior frequência de cancro do pulmão, do cólon, da próstata e da

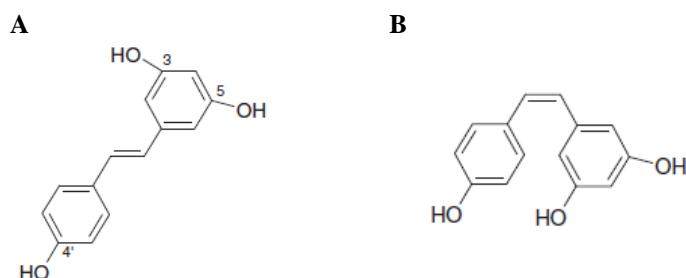
mama nos países de Ocidentais, enquanto na Índia predomina o cancro da cabeça, pescoço e cólo do útero e no Japão o mais incidente é o cancro do estômago (Aggarwal e Shishodia 2006). A dieta alimentar parece ser também um modulador importante do cancro, onde alguns compostos naturais e os seus derivados têm um alto potencial anti-carcinogénico. Assim, alguns desses compostos naturais poderão ser benéficos e algumas podem mesmo vir a agir como potenciais quimioterapêuticos (Hanahan e Weinberg 2000).

## 1.2. Resveratrol

Ao longo dos anos, o resveratrol ganhou especial interesse junto da comunidade científica devido aos seus efeitos anti-cancerígenos, anti-inflamatórios, cardiovasculares e hipoglicémico, bem como devido à sua atividade moduladora de diversas vias envolvidas no crescimento celular e na apoptose (Athar et al. 2007; Mukherjee et al. 2010).

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-estilbeno) é um polifenol da família das fitoalexinas, que se encontra numa grande variedade de espécies de origem vegetal, incluindo uvas, amoras, mirtilos, amendoins, pistácios, entre outros, estando portanto também presente no vinho tinto. Este composto encontra-se em mais de 72 espécies de plantas sendo usado para defesa contra fungos e outros agentes agressores. Como é produzido na pele das uvas após infeção pelo *Bothrytis cinerea*, o resveratrol é assim encontrado em maiores quantidades no vinho tinto (Savouret e Quesne 2002; Dong 2003). Estima-se que por grama de pele de uva, existam cerca de 50 a 100 µg de resveratrol e a concentração deste composto no vinho tinto é cerca de 1,5 a 3 mg/l (Dong 2003).

O resveratrol possui dois anéis fenólicos ligados por uma ligação dupla e pode ocorrer em duas formas, a *cis* e a *trans* (Figura 2), sendo esta última biologicamente mais ativa e mais estável (Chung et al. 2010; Mukherjee et al. 2010).



**Figura 2: Estrutura química do resveratrol, nas duas formas. A: *Trans*-resveratrol; B: *Cis*-resveratrol.**  
Adaptado de Cottart et al. (2010).

Este composto tem sido associado ao “paradoxo francês” porque, apesar de uma dieta rica em gorduras saturadas, a mortalidade por doenças cardiovasculares é relativamente baixa em França. Como o vinho tinto contém entre 0,2 e 5,8 mg/l de *trans*-resveratrol, sugere-se que a baixa incidência de doenças cardiovasculares possa ser explicada pelo consumo moderado de vinho tinto (2 a 3 copos por dia) (Cottart et al. 2010; Kiselev 2011).

### **1.2.1. Biodisponibilidade e farmacologia**

Tal como descrito, uma das principais fontes de resveratrol é o vinho tinto. Desta forma a ingestão de vinho tinto representa uma forma de administração de resveratrol. De notar no entanto que, o teor de resveratrol varia qualitativamente e quantitativamente entre vinhos (Cottart et al. 2010).

O processo de glicosilação protege o resveratrol da degradação oxidativa tornando-o mais estável e mais solúvel, sendo a forma glicosilada mais facilmente absorvida no trato gastrointestinal. No entanto, a ingestão de vinho envolve a absorção de outras substâncias (por exemplo álcool), que podem interagir com os efeitos específicos do resveratrol, sendo difícil avaliar a biodisponibilidade deste composto através do consumo de vinho (Athar et al. 2007). Esta avaliação é ainda mais difícil porque normalmente o vinho é ingerido durante as refeições (Cottart et al. 2010). Após a absorção de resveratrol, este composto é metabolizado no fígado produzindo principalmente derivados de glucurónido e de sulfato (*trans*-resveratrol-3-*O*-glucurónido e *trans*-resveratrol-3-*O*-sulfato). A biodisponibilidade e eficácia destes metabolitos permanecem desconhecidas. Embora se saiba que estes metabolitos estão presentes no plasma por um período de 9h, o tempo de semi-vida plasmática do resveratrol é de 8-14 minutos (Athar et al. 2007; Patel et al. 2010).

Como é altamente lipofílico, o resveratrol é metabolizado da mesma forma que os compostos hidrofóbicos e é eliminado principalmente pela urina. Contudo o resveratrol e/ou os seus metabolitos secundários também estão presentes nas fezes, no plasma, no fígado, nos rins e no coração (Cottart et al. 2010; Patel et al. 2010).

Estudos de farmacocinética têm demonstrado que doses de resveratrol de 5 gramas geram picos médios de concentrações plasmáticas de 2,4 nmol/ml, valores não muito distantes dos níveis em que o resveratrol apresenta efeitos bioquímicos (aproximadamente

10 nmol/ml) relevantes para a ação citotóxica em células tumorais *in vitro* (Patel et al. 2010). Também concentrações de resveratrol entre 32 nM e 100 nM têm demonstrado efeitos biológicos em vários tipos de células e tecidos (Athar et al. 2007).

### **1.2.2. Ação anti-tumoral**

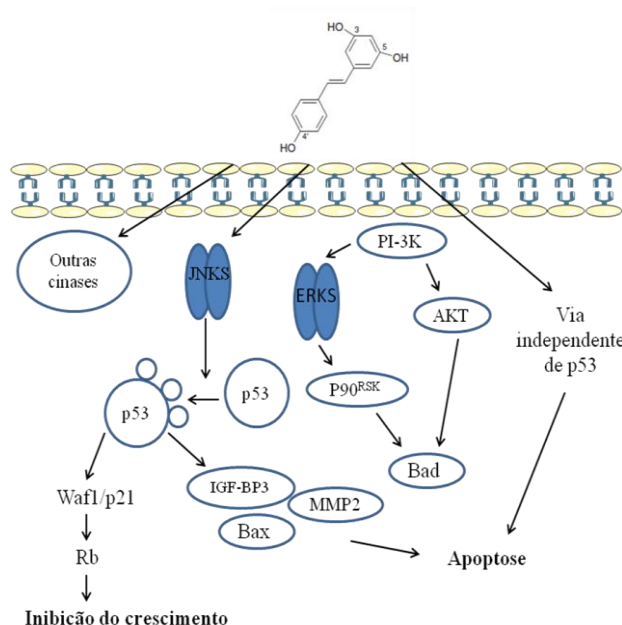
Diferentes estudos demonstraram a toxicidade do resveratrol em diversos tipos de cancro e nos vários estágios da formação de tumores (iniciação, desenvolvimento e progressão), sendo este devido à sua capacidade de supressão da angiogénese e da metástase através do efeito tóxico que exerce nas células tumorais (Athar et al. 2007; Kiselev 2011). Estes efeitos do resveratrol devem-se parcialmente à atividade antioxidante, e à inibição de várias enzimas como a ciclooxigenase 1 (COX1), a proteína cinase C, a proteína do linfoma de células B 2 (Bcl-2), o fator nuclear kB (NF-kB), bem como à fosforilação da proteína Akt e à regulação do ciclo celular (Athar et al. 2007).

O resveratrol também inibe a libertação de ácido araquidónico, promove a ativação da proteína cinase que ativa mitógenos (MAPK) e a desgranulação de mastócitos. Para além disso, o resveratrol possui semelhanças estruturais com compostos estrogénicos, podendo exercer algumas atividades estrogénicas através do recetor de estrogénio (ER). Contudo os mecanismos moleculares pelo qual este composto atua ainda não são totalmente conhecidos (Cho et al. 2002; Dong 2003).

Vários estudos têm demonstrado que o resveratrol induz a apoptose (Figura 3) em diferentes tipos de células, incluindo epidérmicas (JB6), leucémicas promielotias humanas (HL-60), além de várias linhas celulares do cancro do cólon, de cancro da mama e próstata. Dong (2003) demonstrou que o resveratrol inibe a indução do promotor de tumor (TAP) ou pelo fator de crescimento epidérmico (EGF) em células JB6, inibindo a transformação celular para concentrações de resveratrol entre 2,3 e 40 µM. Nesta mesma dose o resveratrol induzia a apoptose. O resveratrol também induz a ativação transcricional dependente de p53. A apoptose induzida pelo p53 ocorre apenas em células que expressam p53 (+/+), não ocorrendo em células com défice de p53 (-/-), o que permite concluir que a p53 é necessária na apoptose induzida pelo resveratrol (Dong 2003).

As proteínas cinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs), a ativação da p38, a ativação de cinases com um terminal N e c-Jun (JNKs) atuam como mediadores da ativação do p53 e da apoptose induzida pelo resveratrol, o qual pode ocorrer parcialmente

através da fosforilação de p53 (Figura 3) (Huang et al. 1999). A atividade anti-tumoral do resveratrol também está relacionada com a sua capacidade de bloquear o ciclo celular na fase G1 ou na transição da fase S para a fase G2 (Dong 2003).



**Figura 3: Representação esquemática da indução da apoptose e inibição do crescimento celular pelo resveratrol.** Um dos mecanismos pelos quais a atividade anti-tumoral do resveratrol parece ocorrer é através de proteínas cinases que regulam sinais extracelulares (ERKs), devido à ativação de proteínas cinases JNKs, bem como a ativação da p38 e da p53 que medeiam a indução da apoptose. Este mecanismo pode ocorrer parcialmente através da fosforilação da p53. Adaptado de Dong (2003).

Para além de todos os efeitos descritos, o resveratrol é também o primeiro polifenol que parece ter efeitos significativos na estimulação da expressão e na atividade de desacetilase da sirtuina 1 (SIRT1), em modelos *in vitro* e *in vivo* (Chung et al. 2010; Pallás et al. 2010). Um aumento da atividade destas enzimas em organismo como leveduras, vermes e moscas pode prolongar o seu tempo médio de vida e para além disso, parecem reduzir a incidência de doenças relacionadas com o envelhecimento em mamíferos, incluindo diabetes, cancro e inflamações (Donmez e Guarente 2010; Verdin et al. 2010). A incidência de cancro, de facto aumenta com a idade e consequentemente com a acumulação de mutações (Saunders e Verdin 2007) Assim, será de esperar que uma ativação ou expressão aumentada das sirtuinas proteja contra o cancro. Por outro lado, a baixa expressão de sirtuinas pode fazer com que as células ignorem a senescência replicativa, permitam a divisão celular sem ocorrer uma correta reparação do ácido



desoxirribonucleico (DNA) e promover a acumulação de mutações que levam ao desenvolvimento de tumores (Saunders e Verdin 2007). Dada a importância das sirtuinas na carcinogénese, estas serão de seguida descritas em maior detalhe.

### 1.3. Sirtuinas

Em leveduras, vermes e moscas, o regulador de informação silenciada (Sir2) e o seu ortólogo em mamíferos, constitui uma família de proteínas denominada de sirtuinas. Estas proteínas são desacetilases dependentes de dinucleótido de nicotinamida e adenina ( $\text{NAD}^+$ ) ou transferases da ribose da adenosina difosfato (ADP) e são altamente conservadas em várias espécies (Donmez e Guarente 2010; Verdin et al. 2010).

Existem sete sirtuinas nos mamíferos (SIRT1 a 7), que são caracterizadas por possuírem um domínio evolutivamente conservado e que é ladeado por terminais N e/ou terminais C de sequências de aminoácidos com comprimento variável (Michan e Sinclair 2007; Verdin et al. 2010). O domínio conservado nas sirtuinas contém atividade catalítica e resíduos de aminoácidos que estão envolvidos na ligação ao  $\text{NAD}^+$  (co-substrato metabólico) (Verdin et al. 2010).

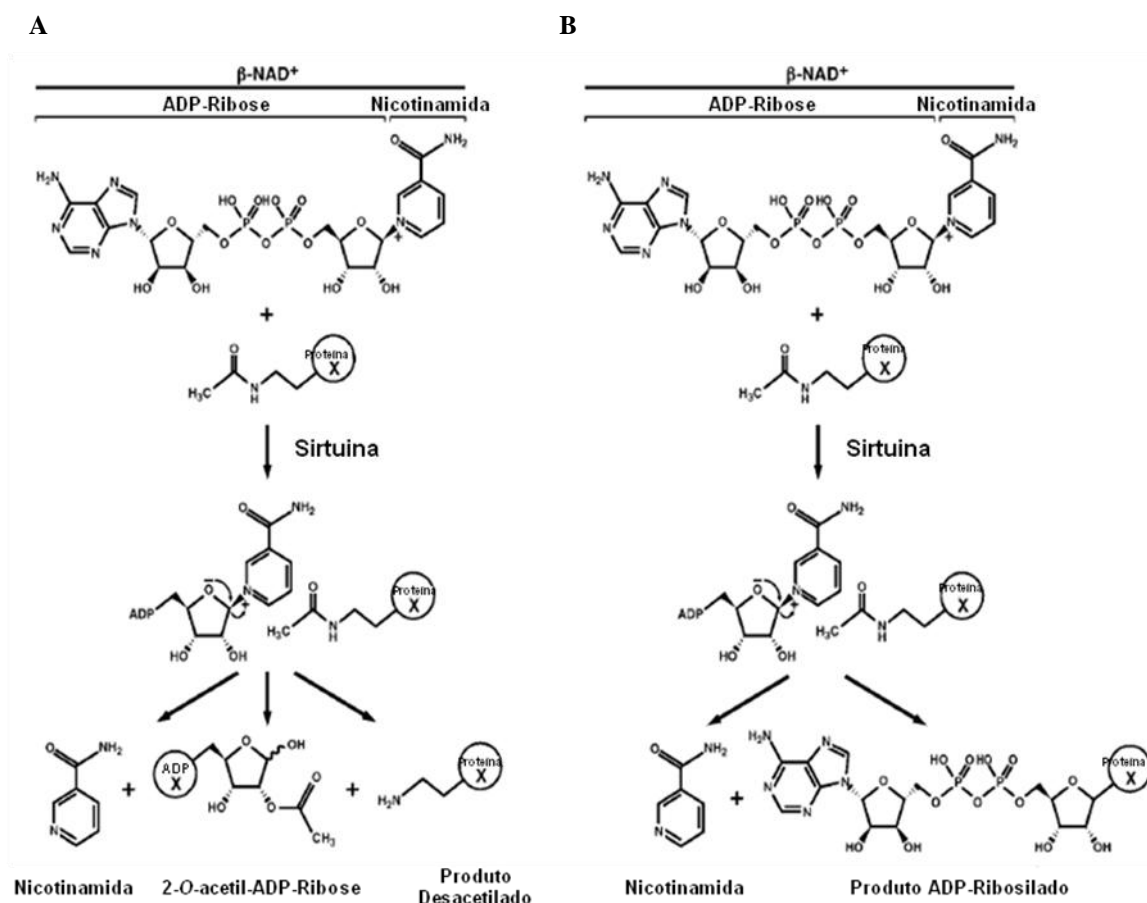
Tendo como base a análise filogenética do seu domínio principal, as sirtuinas presentes nos mamíferos foram classificadas em quatro classes distintas, juntamente com outras proteínas relacionadas com as Sir2, que se encontram tanto noutros eucariotas como em procariotas (Frye 2000; Smith et al. 2000). Assim, a SIRT1 (62 kDa), SIRT2 (41,5 kDa) e SIRT3 (43,6 kDa) estão inseridas na classe I, onde também estão incluídas todas as sirtuinas de leveduras; a SIRT4 (35,2 kDa) está agrupada na classe II, juntamente com as sirtuinas de bactérias, insetos, nematoides, fungos e protozoários; a SIRT5 (33,9 kDa) está inserida na classe III, da qual fazem parte também as sirtuinas de procariotas; as SIRT6 (39,1 kDa) e SIRT7 (44,8 kDa) estão agrupadas na classe IV, onde se encontram também as sirtuinas presentes em metazoários, plantas e vertebrados (no entanto sirtuinas desta classe não se encontram em procariotas). Foi ainda criada uma classe U (*undetermined*) para agrupar sirtuinas com características únicas, onde se incluem as sirtuinas de bactérias gram-positivas e as sirtuinas de *Thermotoga maritima* (Michan e Sinclair 2007).

### 1.3.1. Atividade Enzimática

A atividade catalítica das sirtuinas, ao contrário da maioria de outras desacetilases, é absolutamente dependente de  $\text{NAD}^+$ . Uma vez que os níveis intracelulares de  $\text{NAD}^+$  são dependentes da energia celular e do seu estado redox, as sirtuinas atuam como sensores moleculares do equilíbrio de energia celular (Hao e Haase 2010).

Tal como anteriormente referido, as sirtuinas catalisam dois tipos de reações. Em mais pormenor, as SIRT1, 2, 3, 5 e 7 catalisam a reação de desacetilação na qual um radical acetil do aminoácido lisina é transferido para a unidade de ribose do  $\text{NAD}^+$  (Figura 4A). Por cada acetil-lisina desacetilada há hidrólise de uma molécula de  $\text{NAD}^+$ , com formação de nicotinamida (NAM) e de 2-*O*-acetil-ADP-ribose (2-*O*-acetil-ADPR). Por outro lado, as SIRT4 e 6 possuem uma atividade de ADP-ribose transferase, ou seja, transferem a ribose do ADP para outras proteínas (Figura 4B). De notar no entanto que esta última atividade é de menor relevância nas propriedades biológicas atribuídas às sirtuinas (Yamamoto et al. 2008; Hao e Haase 2010).

Os processos de acetilação e desacetilação proteica são fundamentais para a regulação de modificações pós-translacionais de várias proteínas, com um equilíbrio relativo entre acetilação/desacetilação de ajustes biológicos dessas proteínas. As sirtuinas desempenham um papel significativo nesse equilíbrio. Desta forma, através desta capacidade de desacetilar proteínas, as sirtuinas conseguem ativar ou reprimir proteínas alvo, regulando vários processos biológicos (Kelly 2010). Entre as várias proteínas que são desacetiladas pelas sirtuinas encontram-se as histonas e os fatores de transcrição, tais como o p53, o FOXO (proteínas *forkhead box*), o recetor ativado da proliferação de peroxissoma (PPAR $\gamma$ ), o NF-kB, o PGC-1 $\alpha$ , a  $\alpha$ -tubulina e a sintetase do acetil coenzima A (acetil-CoA) (Pereira et al. 2012).



**Figura 4: Representação dos dois tipos de reações enzimáticas catalisadas pelas sirtuinas.** Em ambas as reações, as sirtuinas utilizam o  $\beta\text{-NAD}^+$  como um cofator. **A:** Reação de desacetilação, na qual um radical acetil é transferido para a ADP-ribose, levando à produção de 2-O-acetil-ADPR e nicotinamida (NAM). **B:** Reação de ribosilação do ADP de proteínas, na qual a ADP-ribose está ligada a uma proteína alvo acetilada e ocorre a formação de nicotinamida (NAM). Adaptado de Saunders e Verdin (2007).

### 1.1.1. Substratos e funções das Sirtuinas

As sirtuínas dos mamíferos têm variadas localizações celulares, vários substratos como alvos e possuem uma grande variedade de funções celulares (Tabela 1) (Haigis e Guarente 2006). Mais especificamente, a SIRT1, SIRT6 e SIRT7 estão localizadas no núcleo (Haigis e Guarente 2006). No entanto, deve referir-se que, embora a SIRT1 seja predominantemente nuclear, esta pode alterar a sua localização em vários tecidos entre o citosol e o nucleoplasma em resposta a diversos estímulos ambientais. Por outro lado, a SIRT3, SIRT4 e SIRT5 estão localizadas na mitocôndria, enquanto a SIRT2 é citoplasmática (Li e Kazgan 2011; Pereira et al. 2012).

**Tabela 1: Sirtuinas de mamíferos** (McGuinness et al. 2011).

Atividade Enzimática		Localização	Substratos	Função
SIRT1	Desacetilase	Nuclear/ Citoplasmática	p53, FOXO, NF-kB, MyoD, Ku70, LXR, PPAR $\gamma$ , p300, Tat, PCAF, ER $\alpha$ , AR, SMAD7, p73, Sox9, HES1, PGC1 $\alpha$ , HEY2, Ncor/SMRT, E2F1, RelA/p65	Metabolismo da glucose, Metabolismo dos ácidos gordos e colesterol, diferenciação, secreção da insulina e neuroprotecção.
SIRT2	Desacetilase	Nuclear/ Citoplasmática	$\alpha$ - tubulina, FOXO	Controlo do ciclo celular, desacetilação $\alpha$ -tubulina.
SIRT3	Desacetilase	Mitocondrial	AceC52, GDH complexo I	Produção de ATP, regulação da desacetilação das proteínas mitocondriais e oxidação dos ácidos gordos.
SIRT4	Ribosil-transferase do ADP	Mitocondrial	GDH, IDE, ANT	Secreção da insulina.
SIRT5	Desacetilase	Mitocondrial	CPS1	Ciclo da ureia.
SIRT6	Desacetilase Ribosil-transferase do ADP	Nuclear	NF-kB, Hif1 $\alpha$ , helicase, DNA polimerase $\beta$	Função dos telómeros e reparação do DNA.
SIRT7	Desacetilase	Nuclear	RNA polimerase tipo I, EIA, SMAD6	RNA polimerase I Transcrição.

Nos tecidos, a SIRT1 é expressa maioritariamente no cérebro (hipotálamo) e está presente também no coração, fígado, rim, pâncreas, baço e músculo-esquelético (Kelly 2010). A SIRT1 atua sobre várias proteínas incluindo a p53, a Ku70 (proteína que atua na reparação do DNA), NF-kB, FOX, PPAR $\gamma$  e PGC-1 $\alpha$  e tem uma função importante na sinalização da insulina, na inflamação, na sobrevivência celular, na regulação do metabolismo e na atenuação do stresse oxidativo e danos no DNA. Desta forma, a atividade desta enzima parece estar associada à longevidade de alguns seres vivos (Haigis e Guarente 2006; Pereira et al. 2012). Um facto interessante é que a estimulação da SIRT1 pelo resveratrol induz efeitos benéficos, tais como maior resistência das células à apoptose e autofagia, redução da adipogénese em células que produzem gordura, aumento da resistência de neurónios ao stresse através de mecanismos dependentes da SIRT1, regulação benéfica do stresse oxidativo e inflamação, atraso no envelhecimento celular, modulação do metabolismo e do ritmo cardíaco, para além de aumentar a biogénese mitocondrial e reduzir a disfunção endotelial em vários modelos (Sauve et al. 2006; Chung et al. 2010). A expressão do gene da SIRT1 tem sido associada a vários fatores de transcrição, que regulam o ciclo celular e a apoptose e que respondem a alterações metabólicas (Rajendran et al. 2011). Entre eles, estão fatores de transcrição que respondem ao stresse oxidativo e a danos no DNA, tais como o E2F1, o qual induz a progressão do ciclo celular da fase G1

para a fase S. A fosforilação de E2F1 pela ATM parece ser um pré-requisito para a regulação da expressão do gene de SIRT1 (Wang et al. 2006). Outros fatores que regulam a expressão do gene da SIRT1 são o p53, o c-Myc e a associação entre o CTBP (sensor redox) e HIC1. Contudo a regulação da expressão do gene da SIRT1 também é regulada a nível da tradução, através do micro-RNA (miRNA), tais como miRNA 34a e miRNA 449a os quais são alvos da p53 e do E2F1, inibindo a expressão da SIRT1 (Rajendran et al. 2011); A SIRT6 é expressa no tecido adiposo, músculo-esquelético, cérebro e tecido cardíaco e apresenta funções na regulação da reparação do DNA, na estabilidade do genoma e na regulação do metabolismo dependentes de nutrientes; A SIRT7 é expressa em variadas células, nomeadamente em adipócitos e cardiomiócitos e promove a transcrição do ácido ribonucleico ribossomal (rRNA) e a regulação do ciclo celular (Haigis e Guarente 2006; Kelly 2010; Pereira et al. 2012).

A SIRT2 está associada aos microtúbulos, onde procede à desacetilação da  $\alpha$ -tubulina. Encontra-se maioritariamente em adipócitos, no cérebro e no sistema nervoso e desempenha funções na regulação do ciclo celular e no desenvolvimento do sistema nervoso (Kelly 2010; Pereira et al. 2012).

A SIRT3 encontra-se maioritariamente nas mitocôndrias do músculo-esquelético, do tecido adiposo, do coração, do fígado e do rim, entre outros tecidos que são metabolicamente ativos. Esta enzima regula a sintetase do acetil-CoA e a proteína desacopladora 1 (UCP-1), estando assim associada à regulação do metabolismo energético mitocondrial; As SIRT4 e 5 também são expressas nas mitocôndrias de tecidos com funções metabólicas importantes, nomeadamente no pâncreas, onde a SIRT4 regula o metabolismo energético mitocondrial e a secreção de insulina, enquanto a SIRT5 é responsável pela regulação do ciclo de ureia e apoptose (Haigis e Guarente 2006; Kelly 2010; Pereira et al. 2012).

#### **1.4. Mitocôndria e morte celular**

Alterações genéticas e/ou metabólicas nas mitocôndrias contribuem para o desenvolvimento de cancro. Este facto, leva a que vários autores tenham alertado para o importante papel das mitocôndrias não só na regulação do metabolismo energético, mas também na sua capacidade de induzir vários tipos de morte celular face a essas alterações (Modica-Napolitano e Singh 2002; Halestrap 2003).

A abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial (MPT, do inglês “*Mitochondrial permeability transition*”) desacopla as mitocôndrias, levando ao colapso na síntese de ATP e a alterações da homeostase iônica (Halestrap 2003). A libertação de algumas proteínas pró-apoptóticas que se encontram no espaço intermembranar da mitocôndria, estão envolvidas na indução da morte celular programada ou apoptose. A libertação dessas proteínas pró-apoptóticas, como por exemplo o citocromo c, ativa a cascata de caspases responsável por alterações e funções celulares que culminam na morte celular (Halestrap 2003). As mitocôndrias também possuem um papel de extrema importância nos processos de controlo de qualidade, através do processo autofágico, seja ele geral ou específico para as mitocôndrias (mitofagia). Desta forma, contrariam a degeneração, minimizam a inflamação e previnem a perda de células (Green et al. 2011).

As mitocôndrias são necessárias para determinar não só a morte da célula, mas também para determinar a natureza da morte que é desencadeada (Halestrap 2003). Devido à importância da mitocôndria na morte celular, esta será alvo de uma descrição mais pormenorizada.

#### **1.4.1. Mitocôndria: Estrutura e função**

As mitocôndrias são alongadas e compostas por quatro compartimentos (Figura 5A), os quais têm composições, funções e atividades distintas: a membrana externa, que é permeável a moléculas pequenas (6 kDa), devido à presença proteínas específicas designadas de porinas; uma membrana interna impermeável que contém enzimas da fosforilação oxidativa e uma série de transportadores para metabolitos e proteínas; o espaço intermembranar que contém proteínas especializadas, mas o qual é contínuo com o citoplasma para moléculas pequenas; e a matriz mitocondrial, onde a maioria das reações bioquímicas ocorrem, visto conter diferentes enzimas de várias vias metabólicas, incluindo o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), a oxidação de ácidos gordos e o ciclo da ureia. A membrana interna é limitante e justaposta à membrana externa, isolando assim a matriz, e é compartimentada em várias cristas membranares, as quais são estruturas tubulares ou lamelares que estão ligadas à membrana interna por estruturas designadas de junções de cristas, levando à expansão da superfície desta membrana. A membrana interna mitocondrial não possui praticamente colesterol, mas é rica em cardiolipina e impermeável a iões. A membrana externa é a estrutura que delimita a mitocôndria e estruturalmente é

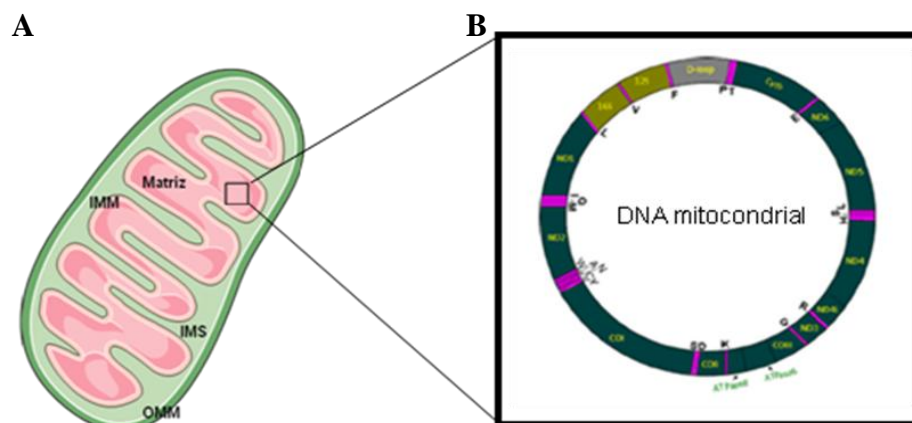
semelhante à maioria das membranas celulares, possuindo algum conteúdo em colesterol (Murphy e Smith 2000; Scheffler 2001; Scatena et al. 2007; Baltzer et al. 2010).

O número de mitocôndrias por célula pode variar de um a vários milhares, dependendo da exigência metabólica do tecido (Raju et al. 2011). As mitocôndrias estão envolvidas em vários processos celulares metabólicos, incluindo a produção de ATP, homeostase do cálcio, proliferação celular, morte celular programada (apoptose) e a síntese de aminoácidos, nucleótidos e lípidos. Embora cada mitocôndria tenha o seu próprio genoma, as proteínas mitocondriais são também codificadas pelo DNA nuclear e a sua distribuição, forma e funções são regulados por estímulos extrínsecos e intrínsecos (Ohta e Nishiyama 2011)

#### **1.4.1.1. Genoma Mitocondrial**

As mitocôndrias possuem o seu próprio genoma, e embora a maior parte das proteínas mitocondriais (~1000) sejam codificadas por genes que existem no núcleo, 13 proteínas são codificadas pelo ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtDNA) de mamíferos, sendo este fundamental para a respiração e para a fosforilação oxidativa (OXPHOS, do inglês “*Oxidative Phosphorylation*”) (Scheffler 2001).

O mtDNA é um DNA de cadeia dupla circular com aproximadamente 16500 pares de bases (pb), que codifica para 37 transcritos: 13 polipeptídeos, 22 ácidos ribonucleicos de transferência (tRNA) e dois rRNA's. Os 13 polipeptídeos são: sete subunidades, designadamente ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 e ND6, do complexo I (NADH desidrogenase); o citocromo b (complexo III); três subunidades, CO1, CO2 e CO3 da citocromo c oxidase (complexo IV); e duas subunidades, ATP6 e ATP8 da ATP sintase (Complexo V) (Figura 5B). O conhecimento do mtDNA é importante na compreensão das bases moleculares das doenças que podem estar relacionadas à disfunção mitocondrial (Raju et al. 2011).



**Figura 5: A: Representação esquemática da mitocôndria.** IMS denota o espaço intermembranar, IMM denota a membrana interna, OMM é a membrana externa e a matriz que é delimitada pelo IMM. Adaptado de Pereira et al. (2009); **B: Mapa do mtDNA de mamíferos.** As bandas a cor-de-rosa indicam sequências que codificam para tRNA's (há 22 tRNAs mitocondriais, cada um é identificado pelo código do aminoácido respetivo). Os segmentos que codificam para proteínas no mtDNA não têm intrões e são transcritos por um mRNA policistrónico de cada banda. Todas as sequências que codificam proteínas estão marcadas a cor verde com a abreviatura do nome do respectivo gene. Abreviaturas: Cit b - citocromo b, ND - NADH desidrogenase, CO - citocromo c oxidase e ATPase - ATP sintase. As duas localizações ribossomais (rRNAs) estão a 12S e 16S. A região do D-loop (cinzento) não tem sequências codificantes. Adaptado de Raju et al. (2011).

#### 1.4.1.2. Bioenergética Mitocondrial

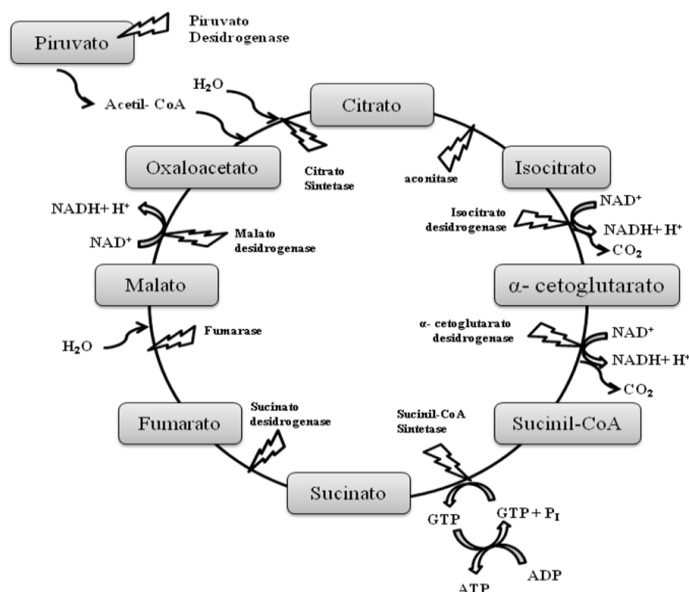
As mitocôndrias desempenham um papel fundamental nos processos metabólicos e bioenergéticos das células (Zick et al. 2009), sendo as proteínas codificadas pelo mtDNA essenciais para o controlo desses processos celulares (Baltzer et al. 2010).

Várias vias metabólicas mitocondriais, incluindo o ciclo de Krebs ou ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e a fosforilação oxidativa, são essenciais tanto na produção de energia pelas células como noutras funções fisiológicas (Ferne et al. 2004).

O ciclo do TCA é um mecanismo fundamental no metabolismo de açúcares, lípidos e aminoácidos (Raimundo et al. 2011). Para este mecanismo ocorrer é necessária a presença de acetil-CoA na mitocôndria, sendo este metabolito maioritariamente obtido no processo de  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos e ainda a partir dos produtos da glicólise (Sweetlove et al. 2010). A presença de acetil-CoA na mitocôndria faz com que o ciclo do TCA mantenha um fluxo cíclico, onde todos os níveis dos componentes intermediários



permanecem constantes. A enzima piruvato desidrogenase (PDH), localizada na matriz mitocondrial, desempenha um papel importante convertendo o piruvato em acetil-CoA (Fernie et al. 2004). Posteriormente ocorre a condensação do oxaloacetato (OAA) e do acetil-CoA, desencadeando uma série de etapas oxidativas que levam à liberação de dois átomos de carbono na forma de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), terminando com nova formação de OAA (Figura 6) (Sweetlove, Beard et al. 2010).

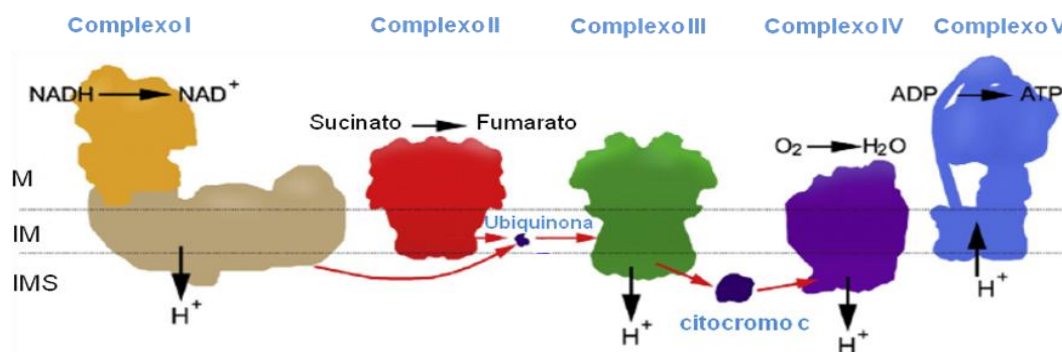


**Figura 6: Representação do ciclo do TCA na mitocôndria.** Este processo ocorre através de uma série de reações químicas com a finalidade de oxidar o acetil-CoA e produzir moléculas que fornecem elétrons para a cadeia respiratória. Adaptado de Pereira et al. (2009).

A oxidação de acetil-CoA em  $\text{CO}_2$  leva à produção de guanosina trifosfato (GTP), NADH e resulta na redução da succinato desidrogenase (Baltzer et al. 2010).

A síntese de ATP pela mitocôndria ocorre através da transferência de elétrons na cadeia respiratória, por um processo designado de fosforilação oxidativa (Pereira et al. 2009). No geral, este processo envolve a oxidação de vários substratos (NADH e succinato), redução de oxigênio a água e a fosforilação de ADP com a consequente formação de ATP (Hebert et al. 2010). A cadeia respiratória é constituída por quatro grandes complexos proteicos, designados de complexo I a IV, que cooperam no transporte de elétrons e no bombeamento de prótons ao longo da membrana interna da mitocôndria (Figura 7) (Chen et al. 2009). O NADH e o succinato funcionam como doadores de elétrons para a cadeia

respiratória: o NADH estimula o complexo I (NADH desidrogenase) e o succinato estimula o complexo II (Succinato desidrogenase) da ETC. Posteriormente, os elétrons são transportados através do complexo III para o complexo IV, onde as moléculas de oxigênio atuam como recetores finais de elétrons (Baltzer et al. 2010). A transferência de elétrons do complexo I e do complexo II para o complexo III é realizada pela ubiquinona, enquanto o citocromo c presente no espaço intermembranar procede à transferência de elétrons do complexo III para o IV (Chen et al. 2009). O funcionamento da ETC gera um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna, onde o refluxo é usado para produzir ATP no complexo V (ATP sintase), ou até mesmo para produzir calor através de proteínas desacopladoras (Baltzer et al. 2010).



**Figura 7: Representação esquemática da cadeia transportadora de elétrons.** Abreviaturas: M – matriz, IMS – espaço intermembranar e IM – membrana interna. Adaptado de Dudkina et al. (2010).

### 1.4.2. Morte Celular

Tal como referido anteriormente, as mitocôndrias exercem uma dupla função na célula. Se por um lado regulam a sobrevivência celular, por outro conseguem induzir a morte da célula (Fulda 2010). Os principais mecanismos de morte celular que podem ser desencadeados em células tumorais a fim de destruir as células malignas são a apoptose, a necrose e a autofagia (Figura 8) (Gogvadze et al. 2009).

#### 1.4.2.1. Apoptose

O termo morte celular programada foi proposto em 1964, para designar o tipo de morte celular que não ocorre de forma acidental. Em 1972, Kerr, Wyllie e Currie sugeriram que fosse utilizado o termo apoptose para indicar este tipo de morte celular

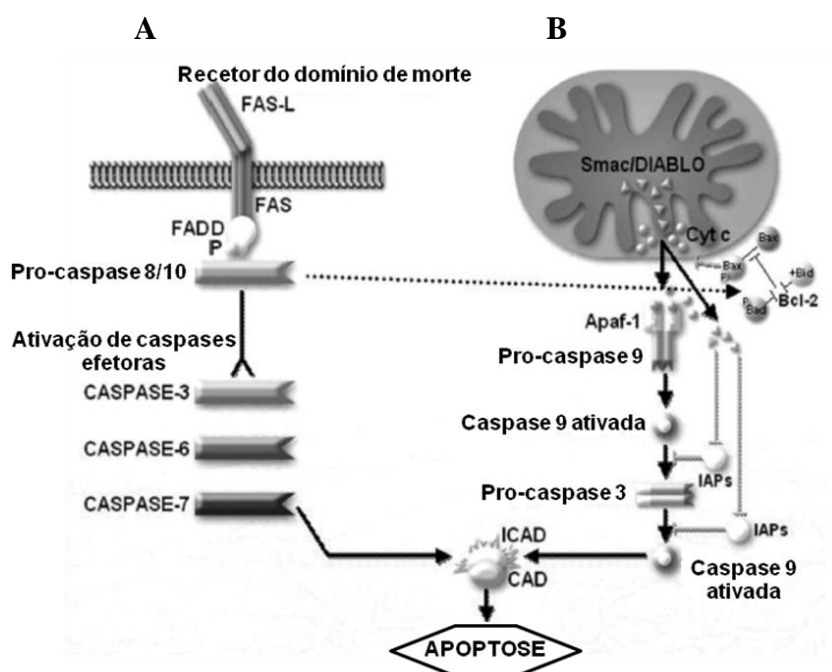
(Grivicich et al. 2007). A apoptose é um mecanismo homeostático que ocorre normalmente durante o desenvolvimento embrionário e envelhecimento. No entanto, este mecanismo também pode ocorrer como uma forma de defesa, nomeadamente em reações imunes ou quando as células são danificadas por agentes nocivos ou em situações de doença (Elmore 2007). O processo de apoptose é caracterizado por alterações morfológicas das células e por mecanismos bioquímicos dependentes de energia (Elmore 2007). As principais alterações morfológicas das células são a redução do seu tamanho, formação de “bolhas” membranares (*blebbing*), condensação da cromatina e fragmentação nuclear (Lowe e Lin 2000). Na fase final deste processo ocorre a rutura da membrana plasmática, levando assim à formação de corpos apoptóticos, que são degradados por macrófagos, prevenindo efeitos inflamatórios (Fink e Cookson 2005). De notar que a base das alterações celulares verificadas na apoptose é centrada na atividade de proteases denominadas caspases (enzimas com um resíduo de cisteína no local ativo e que hidrolisam a cadeia polipeptídica de outras proteínas após clivagem de um resíduo de ácido aspártico). As caspases são sintetizadas como pró-enzimas e são ativadas através de clivagens proteolíticas, que podem ocorrer aquando de estímulos apoptóticos, tais como de recetores transmembranares e libertação de citocromo c da mitocôndria (Chen et al. 2005). De acordo com a sua função na célula, as caspases foram classificadas em caspases iniciadoras (caspase-2, -8, -9, -10) e em caspases efetoras (caspase-3, -6, -7) (Elmore 2007).

Até à data, são conhecidas duas vias apoptóticas distintas, mas que estão relacionadas entre si: a via extrínseca da apoptose (apoptose mediada por recetores de morte) e a via intrínseca da apoptose (apoptose mediada pela mitocôndria) (Figura 8) (Kasibhatla e Tseng 2003).

Na via extrínseca da apoptose, a atividade das caspases é iniciada pelo acoplamento de recetores de morte presentes na superfície das células com os seus ligando específicos. São vários os recetores transmembranares que regulam esta via, tais como o recetor do fator de necrose tumoral 2 (TNFR2), dos quais fazem parte o Fas, o recetor TRAIL e o TNFR. A morte da célula ocorre porque estes recetores recrutam o recetor da proteína adaptadora, FADD (Proteína Fas associada contendo domínio de morte). Neste momento é formado o complexo de sinalização que induz a morte (DISC, do inglês “*Death-inducing signaling complex*”), o qual vai levar à ativação da pro-caspase 8 que posteriormente ativa as caspases efetoras 3, 6 e 7 (Figura 8A) (Chen et al. 2005; Elmore 2007).

A via intrínseca da apoptose é induzida por sinais intracelulares incluindo radiação, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecções virais e radicais livres (Elmore 2007). Todos estes estímulos podem provocar alterações na membrana interna da mitocôndria, o que resulta num aumento da permeabilidade membranar mitocondrial, levando à perda do potencial de membrana e à subsequente libertação de proteínas pró-apoptóticas para o citosol, tais como citocromo c, Smac/DIABLO e proteases de serina (HtrA2/Omi) (Elmore 2007). Uma vez libertado, o citocromo c ativa uma proteína citoplasmática designada por fator de ativação de proteases apoptóticas (Apaf-1), a qual juntamente com o citocromo c e a pro-caspase 9 forma um complexo proteico designado por apoptossoma. Por sua vez, este promove a clivagem da pro-caspase 9, ativando a caspase 9 (Figura 8B) (Elmore 2007).

Para além do descrito acima, a mitocôndria desempenha outras funções importantes na regulação da morte celular por esta via. Neste contexto, os membros da família das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, tais como, Bcl-2 e Bcl-XL podem ser encontrados na membrana externa da mitocôndria e atuam para promover a sobrevivência celular. De notar que muitos membros da família das proteínas pro-apoptóticas, tais como Bax e Bad, medeiam os efeitos interagindo com Bcl-2 e Bcl-XL ou através de interações diretas com a mitocôndria (Chen et al. 2005).



**Figura 8: As duas principais vias da Apoptose. A:** Via extrínseca da apoptose, a qual é ativada através do recetor de morte (Fas); **B:** Via intrínseca da apoptose, que quando estimulada leva à libertação de citocromo c da mitocôndria e ativação de sinais de morte. Ambas as vias envolvem a ativação de caspases, que hidrolisam moléculas reguladoras e estruturais, culminando na morte celular. Adaptado de Ghobrial et al. (2005).

#### **1.4.2.2. Necrose**

Contrariamente à apoptose, a necrose é caracterizada por ser um processo menos controlado. A morte celular ocorre de forma acidental resultante de perturbações ambientais, ocorrendo a libertação descontrolada de conteúdos celulares inflamatórios (Fink e Cookson 2005). Uma vez que a necrose é um processo de degradação que ocorre após a morte celular, tem sido considerada por alguns autores como sendo inadequada para descrever um mecanismo de morte celular. Por essa razão, a oncosse é usada para descrever o processo que conduz à necrose (Elmore 2007). A oncosse é definida como um caminho pré-letal que leva à morte celular. Este processo leva à depleção de energia e à falha das bombas iónicas na membrana plasmática (Fink e Cookson 2005). Por sua vez, a lesão celular necrótica é mediada por dois mecanismos principais: interferência com o fornecimento de energia da célula e danos diretos nas membranas celulares. As principais alterações morfológicas que ocorrem durante a necrose são: inchaço celular, formação de vacúolos citoplasmáticos, distensão do retículo endoplasmático, formação de bolhas citoplasmáticas, mitocôndrias condensadas, inchadas ou até mesmo ruptura, desagregação ribossomal, rupturas da membrana celular. Esta ruptura da membrana celular envia sinais quimioestáticos que recrutam células imunes e inflamatórias, promovendo o processo inflamatório (Elmore 2007).

#### **1.4.2.3. Autofagia**

A autofagia é responsável pela degradação de componentes celulares dentro da célula através de vacúolos autofágicos (Clarke 1990). A autofagia é um fenómeno geralmente protetor e de reciclagem de componentes citoplasmáticos. No entanto, existem evidências que quando o fluxo autofágico sofre um descontrolo, a célula poderá sofrer um processo de morte celular irreversível (Levine e Yuan 2005). A autofagia é um processo altamente regulado e em alguns casos apresenta características morfológicas tais como, vacuolização, degradação do conteúdo citoplasmático e condensação ligeira da cromatina (Bursch 2001). A via autofágica inicia-se com o recrutamento do material citoplasmático através de vesículas de membrana dupla, designadas de autofagossomas. Este processo é controlado por GTPases, pela fosfatidilinositol quinase e envolve a conjugação de sistemas de ubiquitina. Em seguida, os autofagossomas fundem-se com lisossomas num processo dependente dos microtúbulos e os conteúdos são degradados e/ou reciclados como fonte de

energia (Fink e Cookson 2005; Green et al. 2011). A autofagia pode ocorrer como um processo geral (quando as células não possuem nutrientes e mobilizam as suas reservas de energia), ou pode ocorrer especificamente sobre diferentes estruturas celulares, tais como sobre a mitocôndia, processo designado de mitofagia (Green et al. 2011).

## CAPÍTULO 2

---

### HIPÓTESE E OBJETIVOS

O resveratrol parece ter um elevado efeito quimioprotetor e citotóxico em vários tipos de cancro (Dong 2003). Embora os mecanismos exatos pelos quais este composto atua ainda não sejam totalmente conhecidos, a sua atividade parece ter efeitos na estimulação de sirtuinas, nomeadamente da SIRT1. Como as sirtuinas participam em vários mecanismos de resposta ao stresse, surgem evidências que as estas proteínas estão envolvidas na regulação do metabolismo tumoral (Chung et al. 2010; Cottart et al. 2010; Pallás et al. 2010).

O resveratrol apresenta toxicidade diferencial para vários tipos de linhas celulares tumorais (Athar et al. 2007), sendo que essa toxicidade pode estar relacionada com a expressão de diferentes sirtuinas. Desta forma, este composto poderá ser um bom aliado no desenvolvimento de novas terapêuticas no combate a vários tipos de cancro. A hipótese geral para o nosso trabalho é a de que a diferente ação citotóxica do resveratrol em várias linhas celulares tumorais está ligada a uma diferente quantidade basal e posterior alteração do conteúdo em SIRT1 e SIRT3. Neste contexto, os principais objetivos desta tese são:

1. Avaliar o grau de toxicidade do resveratrol em várias linhas celulares tumorais;
2. Avaliar a quantidade de sirtuinas (SIRT1 e SIRT3) nessas linhas celulares pré-tratamento;
3. Verificar se o tratamento com resveratrol induz alterações no perfil de expressão da SIRT1 e da SIRT3 em linhas celulares tumorais.



## CAPÍTULO 3

---

### MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Reagentes e compostos químicos utilizados

Os reagentes albumina de soro bovino (BSA), persulfato de amónia (APS), reagente de Bradford, azul brilhante G, cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) ditioneitol (DTT), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), dimetilsulfóxido (DMSO),  $\beta$ -mercaptoetanol a 98%, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), cocktail inibidor de proteases (contendo 1mg/ml de leupeptina, antipaina, quimostatina e pepstatina A), azida de sódio, cloreto de sódio (NaCl), ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazina etanossulfónico (HEPES), dodecil sulfato de sódio (SDS), sulforodamina B (SRB), trizma base, Tris pH 8.8, Tris pH 6.8 e a solução de azul de tripano foram obtidas na Sigma-Aldrich Chemical Co. (Saint Louis, MO, EUA). Os reagentes ácido acético, etanol, ácido clorídrico (HCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), hidrogenocarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), fosfato monossódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), metanol, sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos da Merck (Whitehouse Station, NJ, EUA). A acrilamida, tampão de laemmli, membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) e *N,N,N',N'*-tetrametiletenodiamina (TEMED) foram obtidos a partir da BioRad (Hercules, CA, EUA). O sistema de detecção de ECF foi obtida a partir Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, Reino Unido).

As sondas fluorescentes éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM) e Hoechst 33342 foram ambas obtidas da Molecular Probes (Eugene, OR, EUA)

Todos os reagentes e compostos químicos utilizados foram os de maior grau de pureza comercialmente disponíveis. A fim de minimizar a contaminação com iões de metal, todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (condutividade  $<18 \mu\text{S.cm}^{-1}$ ), obtida num sistema Milli Q (Millipore).

### 3.2. Linhagens Celulares

Foram utilizadas diferentes linhagens celulares cancerígenas humanas, nomeadamente células de cancro de pulmão A549 (CCL-185, ATCC, Manassas, VA, USA) e células de cancro da mama MCF-7 (86012803, ECACC, United Kingdom) e MDA-MB-231 (92020424, ECACC, United Kingdom). A linha H9c2 (CRL-1446, ATCC, Manassas, VA, USA), originária de coração embrionário de rato, foi também usada neste trabalho. Esta linha celular tem sido usada no nosso laboratório como um modelo celular para células cardíacas (Sardao et al. 2009).

### 3.3. Cultura de Células

As células A549 foram cultivadas em meio de cultura com glucose, constituído por meio *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM, 12440, GIBCO - Invitrogen), suplementado com 5% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina. Todas as outras linhas celulares foram cultivadas em meio de cultura com glucose, constituído por meio *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM, D5648) e suplementado com 0,11 g/l de piruvato de sódio, 1,8 g/l de bicarbonato de sódio, FBS a 10% e antibiótico penicilina-estreptomicina a 1%. Todas as linhas celulares cresceram em pratos de cultura de plástico (100x20 mm) e foram mantidas numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C. As linhas celulares foram também cultivadas em meio com galactose/glutamina, composto por DMEM (D5030) isento de glucose e suplementado com 1,8 g/l de galactose, 0,584 g/l de L-glutamina, 0,11 g/l de piruvato de sódio, 1,8 g/l de bicarbonato de sódio, FBS a 10% e antibiótico penicilina-estreptomicina a 1%, tendo as condições de crescimento sido equivalentes às anteriormente descritas. Com exceção do IMDM, todos os reagentes usados foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

Todas as experiências foram realizadas com culturas na fase de crescimento exponencial (log). Ao atingir níveis de confluência de aproximadamente 70 %, as células foram passadas por tripsinização, usando tripsina/ EDTA a 0,25%.

### 3.4. Ensaio da Proliferação celular

O ensaio de Sulforodamina B (SRB) foi efetuado de forma a avaliar o efeito do resveratrol na proliferação celular nas várias linhas celulares nas diferentes condições de cultura descritas anteriormente. O método de sulforodamina é baseado na ligação electrostática do corante de sulforodamina B às proteínas celulares e a quantidade de corante libertado é proporcional ao número de células presentes na amostra sendo um indicador da proliferação celular (Lin et al. 1999).

As células foram colocadas em placas de cultura de 48 poços, com um volume final de 500 µl por poço e com um número inicial de células de  $1 \times 10^4$  células/poço. Após 24h, as células foram tratadas com concentrações de 10µM, 25µM e 50 µM de resveratrol (R0510; Sigma-Aldrich). E o veículo nas condições de controlo (DMSO, co 1% (v/v)). O meio de cultura foi aspirado 24h e 48h depois da incubação com o composto ou DMSO e de

seguida, as células foram fixadas por tratamento com 1% de ácido acético em metanol frio, por um período mínimo de 24h. Após remoção da solução, as células foram fixadas com 0,5% (w/v) de SRB dissolvido em 1% de ácido acético, durante 1h a 37°C e o corante foi removido por lavagem com uma solução de 1% de ácido acético. O corante ligado à proteína das células vivas foi extraído com uma solução de 10 mM de Tris a pH 10 e a densidade ótica da solução foi medida a 540 nm num leitor de placas VICTOR X3 (Perkin Elmer, Inc.). Os resultados foram expressos em % em relação ao controlo.

### **3.5. Microscopia de Epifluorescência**

A técnica de microscopia de epifluorescência foi utilizada para detetar alterações morfológicas na condensação da cromatina e/ou alterações na distribuição da rede mitocondrial das células. Para estes ensaios, as células foram plaqueadas em placas de cultura de seis poços (volume final de 2 ml por poço e com um número inicial de células de  $1 \times 10^4$  células/poço) com uma lamela de vidro de 16 cm dentro de cada poço. Após crescimento durante 2 dias nas condições de humidade, pH e temperatura equivalentes às anteriormente mencionadas, procedeu-se à substituição do meio de cultura das células e ao tratamento com resveratrol na concentração de 25  $\mu$ M por um período de 24h e 48h. Às células controlo adicionou-se o veículo (DMSO, co 1% (v/v)). Trinta minutos antes do fim do tempo de incubação, as células foram incubadas com sondas fluorescentes, TMRM (100 nM) e Hoechst 33342 (1 mg/mL) numa solução de microscopia (120 mM de NaCl, 3,5 mM de KCl, 0,4 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM de HEPES, 5 mM de  $\text{NaHCO}_3$ , 1,2 mM de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e 10 mM de piruvato de sódio a pH 7,4) suplementada com 1,2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1,3 mM de  $\text{CaCl}_2$  e FBS a 5%. As imagens foram obtidas num microscópio de epifluorescência invertido Zeiss Microscoper Z1 com uma ampliação de 400x e foram tratadas com recurso ao programa ImageJ 1.45S.

### **3.6. Western Blot**

#### **3.6.1. Condições de cultura das células**

Todas as linhagens celulares foram plaqueadas em pratos de cultura de plástico (150x20 mm), com um volume final de 28 ml por prato de cultura e com um número inicial de células entre  $1 \times 10^5$  e  $5 \times 10^5$  células/prato, onde cresceram durante 4 dias de modo a atingirem uma elevada confluência. Findo esse período, o meio de cultura foi aspirado e

substituído por meio novo. Após esse procedimento, o resveratrol foi preparado em DMSO e adicionado aos meios de cultura das células com glucose e galactose/glutamina de constituições descritas anteriormente na seção 3.3., nas concentrações de 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M durante períodos de 24h e 48h. Às células controlo adicionou-se o veículo (DMSO, co 1% (v/v)).

### **3.6.2. Recolha de extratos totais das células**

Todo o meio de cultura foi recolhido para um falcon de 50 ml e as células foram tratadas com 7 ml de tripsina/ EDTA a 0,25% por cada prato de cultura durante 3 minutos a 37° C, sendo esta posteriormente inibida por adição do 7 ml de meio de cultura previamente recolhido. A suspensão celular foi recolhida para falcon 50 ml e centrifugada a 1000g durante 4 minutos à temperatura de 5°C. Após rejeitar o sobrenadante, o precipitado foi ressuspensão em 5 ml de PBS. Após nova centrifugação nas condições semelhantes às anteriores, as células (precipitado) foram lisadas por adição de 100  $\mu$ l da solução de lise (20 mM de HEPES/NaOH, pH 7,5, 250 mM de sucrose, 10 mM de KCl, 2 mM de  $MgCl_2$ , 1 mM de EDTA), suplementado com 1 mM de DTT, 100 mM de PMSF e um cocktail com inibidor de proteases.

A concentração proteica obtida nos extratos totais de células foi determinada pelo método de Bradford, utilizando como padrão o BSA. Este método consiste na determinação de proteínas totais, através da interação entre o corante azul brilhante Coomassie (BG-250) e as macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. A ligação do corante à proteína desvia o máximo de absorção do corante de 465 nm para 595 nm (Bradford 1976). Desta forma a densidade ótica da solução foi medida no VICTOR X3 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, Inc.) a 595 nm.

### **3.6.3. Anticorpos utilizados**

Foram usados os anticorpos primários para a SIRT1 (ab110304, 1:1000) da Abcam (San Francisco, CA, USA) e para a SIRT3 (sc-49744, 1:1000) da Santa Cruz Biotechnology (San Diego, CA, USA). Os anticorpos secundários utilizados foram o *goat anti-rabbit IgG-AP* (sc-2007; 1:2500), *anti-mouse IgG1* (1:2500), ambos da Santa Cruz Biotechnology (San Diego, CA, USA).

### **3.6.4. Procedimento do Western Blot**

Iguais quantidades de proteína total das diferentes amostras foram desnaturadas a 95°C durante 5 minutos. Cinquenta microgramas de extrato de proteína total foram separados por eletroforese num gel de 12% SDS-PAGE, e em seguida as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF. Depois de bloqueadas com 5% de leite em TBST (50mM Tris-HCl, pH 8; 154mM NaCl e 0.1% Tween 20) durante 2 horas à temperatura ambiente, as membranas foram incubadas durante a noite à temperatura de 4°C com os anticorpos primários. Depois de 3 lavagens com TBS-T 1X durante 5 minutos cada, as membranas foram incubadas com o respetivo anticorpo secundário durante 1 hora à temperatura ambiente, novamente lavadas e de seguida reveladas usando o reagente quimiofluorescente ECF (Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido) durante 5 minutos. A visualização das bandas imunorreativas foi efetuada usando o sistema de deteção de quimiluminescência (VersaDoc, da Bio-Rad). As proteínas contidas nas membranas de PVDF após a transferência, foram visualizadas após marcação com o corante Ponceau S, de forma a confirmar uma equivalente quantidade de proteína em cada poço.

A quantificação da densidade de cada uma das bandas foi analisada usando o software Quantity One (Bio-Rad). Os dados da expressão proteica correspondem à densidade das bandas (proteína SIRT1 ou SIRT3) vs ponceau, e foram expressos em % do controlo.

### **3.7. Análise Estatística**

Os resultados foram tratados no programa GraphPad Prism 4,0 (GraphPad Software, Inc.), e foram expressos com o respetivo  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e analisados por um Teste ANOVA de duas vias seguindo o método de comparações múltiplas de Bonferroni de forma a comparar duas variáveis independentes. Os valores com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## CAPÍTULO 4

---

## RESULTADOS

#### 4.1. Efeitos citotóxicos do resveratrol

De forma a avaliar o efeito do resveratrol na proliferação das células tumorais (MDA-MB-231, MCF-7 e A549) e não tumorais (H9c2), estas foram tratadas com concentrações de 10, 25 e 50  $\mu\text{M}$  de resveratrol por um período de 24h ou 48h. Tal como pode ser observado na figura 9, de uma forma geral o resveratrol produziu uma diminuição no número de células em todas as linhas celulares testadas e nas diferentes condições de crescimento celular (meio com glucose ou meio com galactose). Com exceção das células A549, todas as outras linhas celulares não apresentaram efeitos significativos em termos de citotoxicidade celular para a concentração de 10  $\mu\text{M}$  de resveratrol, independentemente do tempo de exposição ou do meio em que as células foram cultivadas.

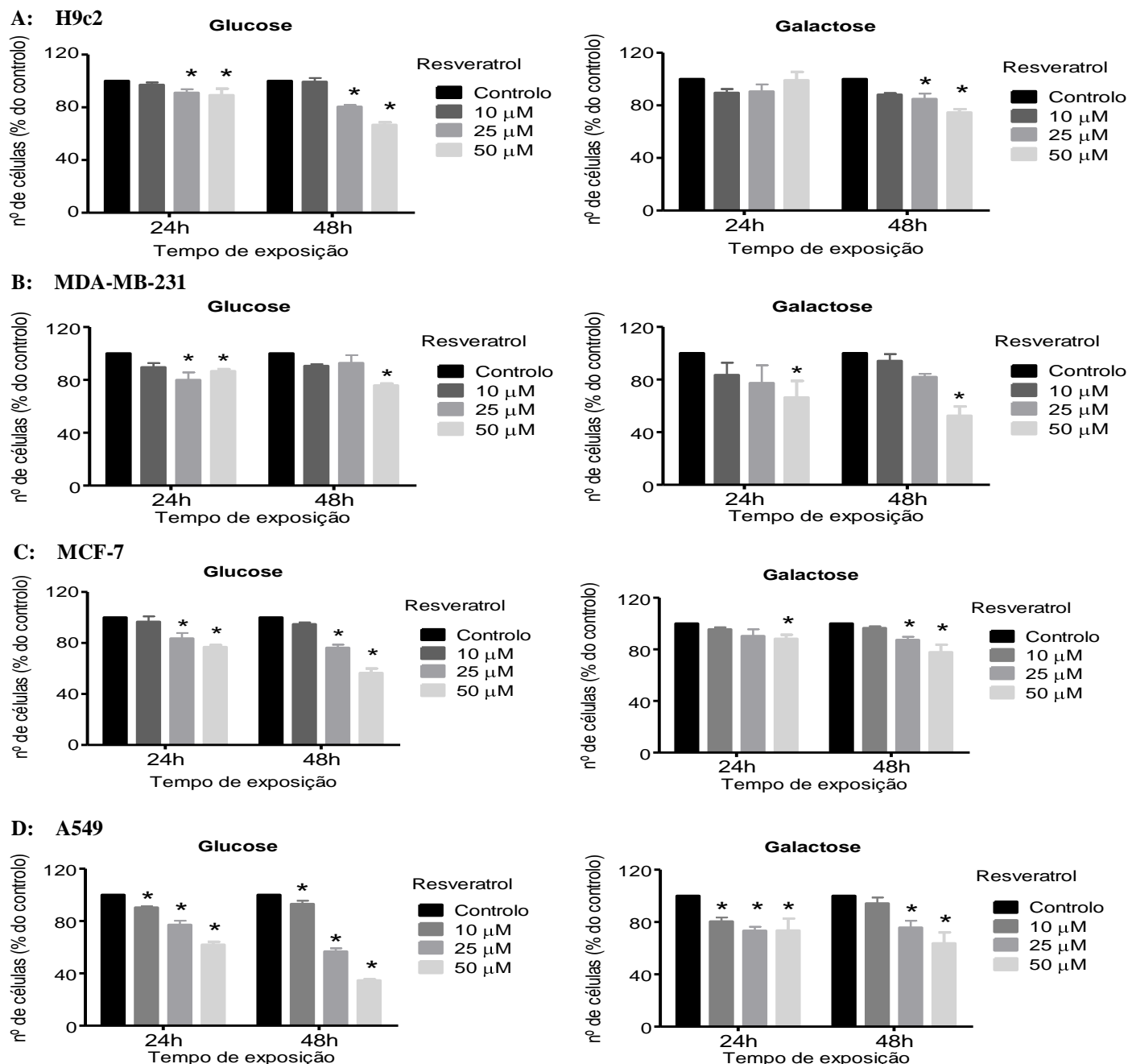
Em relação às células não tumorais (H9c2) cultivadas em glucose, o resveratrol inibiu a sua proliferação para concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  (24h e 48h). Contudo, quando cultivadas em meio de galactose, as células foram apenas sensíveis ao resveratrol para o período mais longo de exposição (Figura 9A).

Os resultados obtidos para os dois modelos celulares de cancro da mama, MDA-MB-231 e MCF-7, foram diferentes entre si. Ambas as linhas celulares apresentaram um decréscimo do número de células quando cultivadas em glucose e tratadas com 25 e 50  $\mu\text{M}$  de resveratrol durante 24h. No entanto para o tempo de exposição de 48h ao composto, as células MDA-MB-231 demonstraram ser menos sensíveis ao resveratrol do que as MCF-7 (Figura 9B e C). Ainda, quando cultivadas em galactose e sujeitas a tratamento com resveratrol durante 24h, o número de células em ambas as linhas da mama foi inibido para a concentração de 50  $\mu\text{M}$ . No entanto para um tratamento mais prolongado com resveratrol (48h) as células MCF-7 apresentaram ser novamente mais sensíveis ao resveratrol do que as MDA-MB-231, uma vez que um menor número de células foi medido para as concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$ , enquanto para as MDA-MB-231, apenas a concentração de resveratrol mais elevada (50  $\mu\text{M}$ ) revelou resultados significantes (Figura 9B e C).

Em relação às células de cancro do pulmão, A549, os resultados indicam que de todas as linhas testadas, estas são as mais sensíveis ao resveratrol. À exceção da condição de cultivo em galactose e tratamento com resveratrol de 10  $\mu\text{M}$  durante 48h, todos os outros tratamentos induziram efeitos citotóxicos nestas células (Figura 9D).



De referir ainda que todas as linhas celulares apresentaram maior sensibilidade ao resveratrol quando cultivadas em meio com glucose, em relação à demonstrada em meio com galactose (Figura 9).



**Figura 9: Efeitos do resveratrol no número de células em linhas não tumorais (A: H9c2) e tumorais (B: MDA-MB-231; C: MCF-7; D: A549).** As células foram incubadas com as várias concentrações de resveratrol (10, 25 e 50  $\mu$ M) durante 24h e 48h. A avaliação do número de células foi efetuada pelo ensaio colorimétrico da Sulforodamina B (SRB), de acordo com os procedimentos descritos na secção 3.4. dos materiais e métodos. O controlo (100%) para cada um dos tempos de exposição foi determinado como sendo a ausência de tratamento. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM, de três experiências independentes. As amostras identificadas com (\*) indicam uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controlo ( $p < 0,05$ ).

#### **4.2. Avaliação da morte celular induzida pelo resveratrol**

As alterações morfológicas apoptóticas, como a condensação da cromatina nuclear e/ou alterações na morfologia da rede mitocondrial das várias linhas celulares utilizadas, foram avaliadas pela técnica de Microscopia Vital de Epifluorescência, usando sondas fluorescentes específicas. Neste contexto, foram utilizadas duas sondas fluorescentes, a TMRM, que é acumulada electroforéticamente em mitocôndrias polarizadas, e o Hoechst 33342, que se liga ao DNA nuclear. Para estes ensaios foi utilizada apenas a concentração de 25  $\mu$ M de resveratrol por ser onde se observaram efeitos significativos na inibição da proliferação celular, apesar de não serem os mais drásticos.

Os resultados obtidos (Figura 10) permitiram verificar que as células não tumorais (H9c2) possuem uma morfologia celular normal, a rede mitocondrial bem definida e filamentosa, e com núcleos de dimensões normais, quer nas condições controlo, quer quando expostas a 25  $\mu$ M de resveratrol, nas culturas com glucose e galactose e nos dois tempos de exposição (24h e 48h). Deve no entanto salientar-se que quando cultivadas em glucose e expostas a 25  $\mu$ M de resveratrol, as células apresentaram uma ligeira diminuição da fluorescência, o que pode refletir uma despolarização mitocondrial. Ainda, o tratamento com resveratrol destas células cultivadas em galactose induziu um aumento da fluorescência da TMRM, sugerindo uma maior acumulação na mitocôndria (Figura 14).

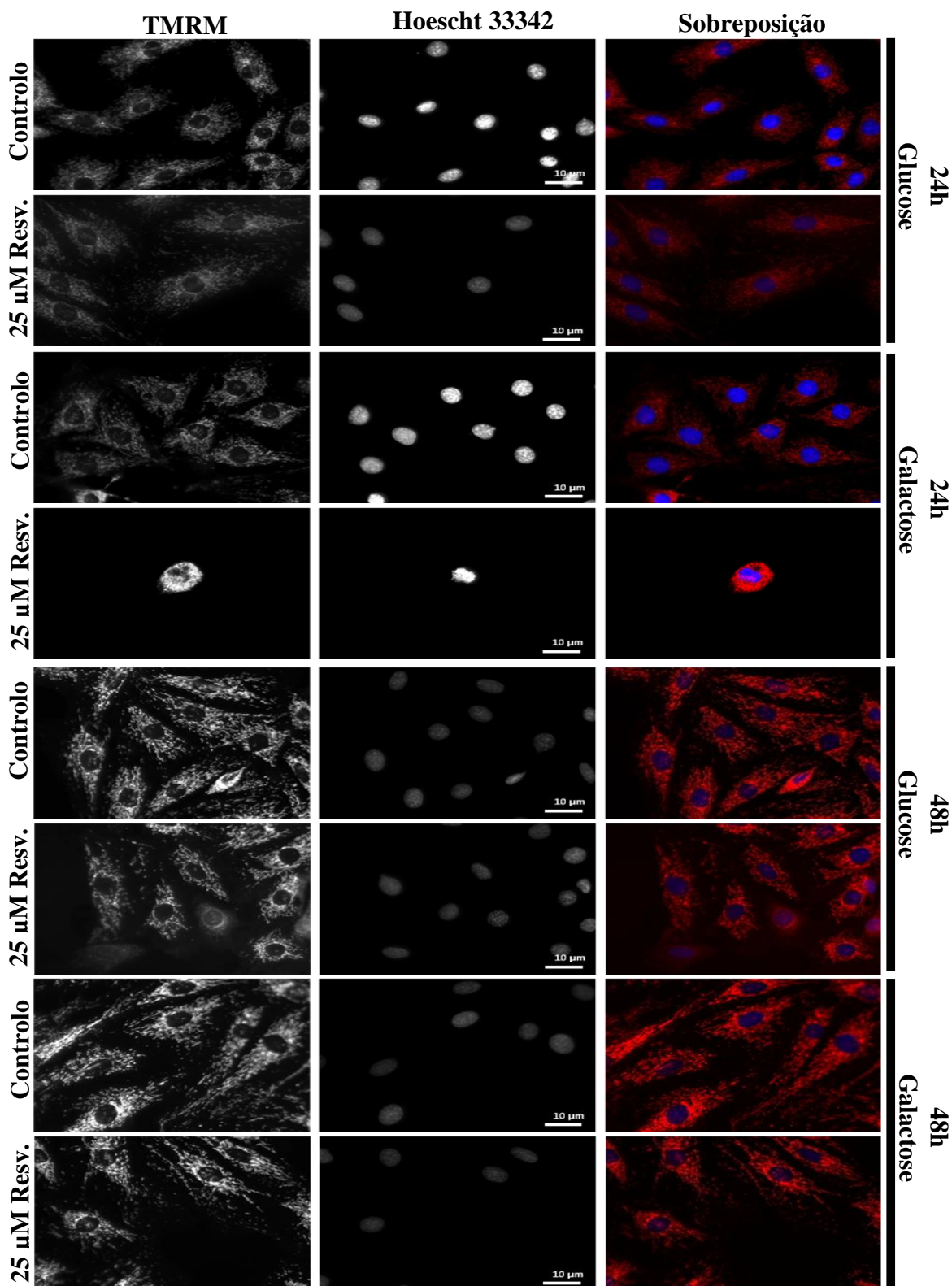
Em relação à linha celular MDA-MB-231, os grupos controlo apresentaram uma morfologia normal, uma rede mitocondrial bem definida parcialmente filamentosa e os núcleos com dimensões normais (Figura 11). Contudo, após 24h de tratamento com resveratrol, nas duas condições de crescimento celular (glucose e galactose), verificou-se que a morfologia celular deixou de ser normal, a rede mitocondrial tornou-se mais fragmentada, sendo que em algumas células nenhuma marcação com TMRM foi visível. De uma forma geral observou-se que os núcleos das células assumiram uma morfologia tipicamente apoptótica (condensação da cromatina). Estas mesmas alterações ocorrem também para o tempo mais alargado de exposição ao composto (48h). As alterações sugerem a despolarização da membrana mitocondrial e possivelmente morte celular por apoptose. Estes resultados podem ser facilmente observados quando efetuada a quantificação da fluorescência de TMRM nas células nestas condições experimentais (Figura 14). De facto, à exceção da condição experimental de cultura celular em glucose e exposta ao resveratrol durante 24h, foi observada uma diminuição do desvio padrão da

fluorescência intracelular (Figura 14), o que sugere uma perda do potencial de membrana mitocondrial.

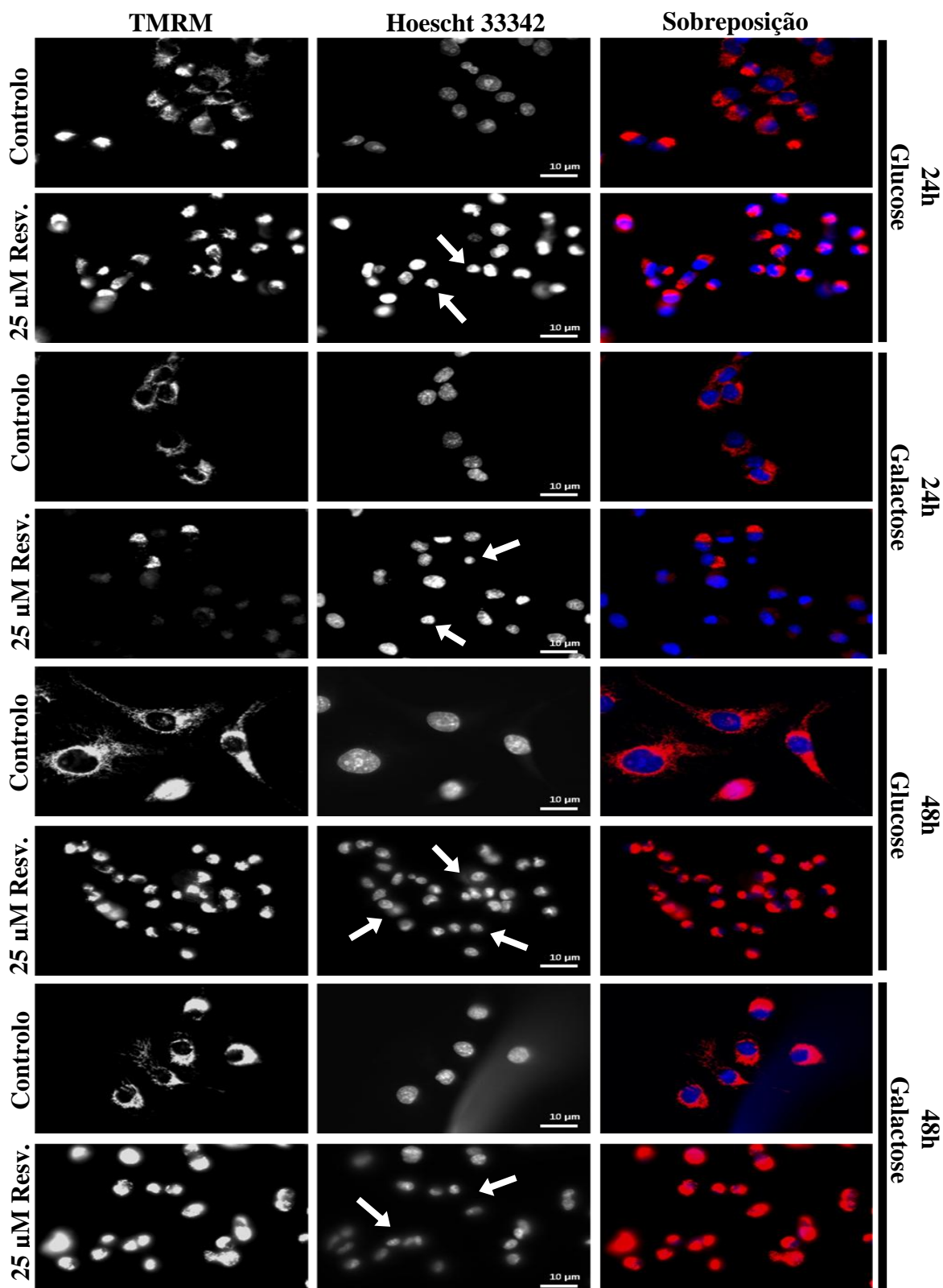
Também para as condições controlo da outra linha celular de cancro da mama, MCF-7 e para a linha celular de cancro do pulmão (A549) se obtiveram resultados semelhantes com as ocorridas nas células MDA-MB-231. Na condição controlo, as células apresentaram uma morfologia normal, uma rede mitocondrial bem definida e filamentosa, e os núcleos com dimensões normais (Figuras 12 e 13). Quando as células MCF-7 foram tratadas durante 24h ao resveratrol não apresentaram grandes alterações morfológicas e na distribuição da sua rede mitocondrial. Contudo, após 48h de tratamento com resveratrol, verificou-se que a marcação com TMRM foi reduzida assim como uma diminuição no tamanho dos núcleos (Figura 12), sugerindo também a morte celular por apoptose.

Os resultados confirmaram que as células A549 foram as mais sensíveis ao resveratrol. De facto, após 24h de exposição ao composto verificaram-se alterações na morfologia celular, com alterações da polarização e morfologia da rede mitocondrial e em algumas células ocorreu mesmo a diminuição dos núcleos. Para 48h de tratamento com resveratrol a rede mitocondrial foi impossível de distinguir (Figura 13), porque ocorreu uma diminuição da fluorescência da TMRM nesta linha celular (Figura 14).

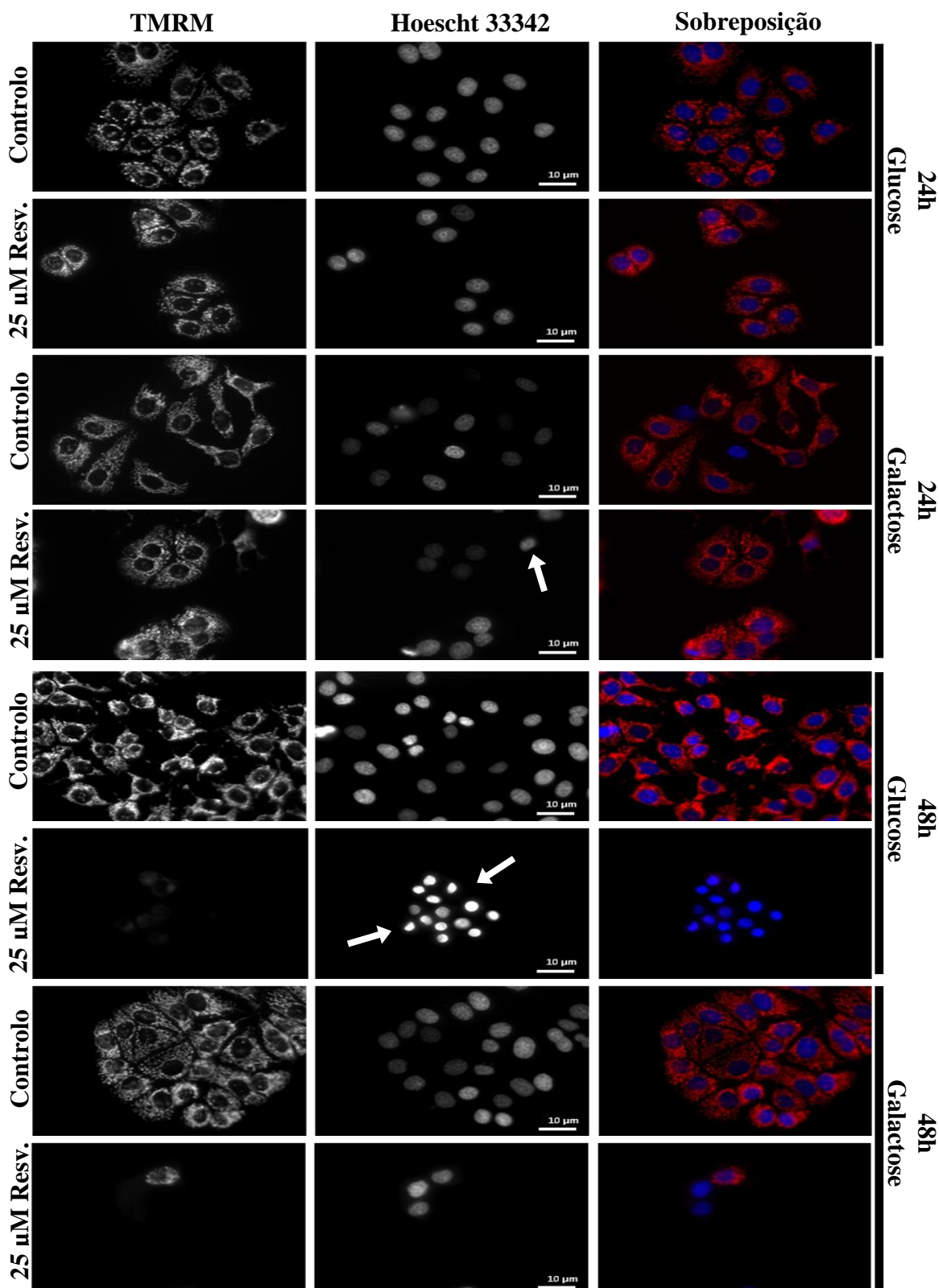
A diminuição da fluorescência de TMRM nas células MCF-7 e nas células A549 foi evidente quando estas foram cultivadas em glucose e após 48h de tratamento com resveratrol, embora nas células MCF-7 cultivadas em galactose essa diminuição da fluorescência ocorreu apenas às 48h de exposição ao composto enquanto ocorreu em ambos os tempos de exposição ao composto para as células A549 (Figura 14).



**Figura 10: Imagens de Microscopia de Epifluorescência mostram os efeitos do resveratrol na morfologia celular e na rede mitocondrial na linha celular não tumoral (H9c2).** As células foram incubadas com uma concentração de resveratrol de 25 $\mu$ M durante 24h e 48h. Trinta minutos antes de terminar o período de incubação, as células foram tratadas com TMRM (100 nM) e Hoescht 33342 (1mg/ml), de acordo com os procedimentos descritos na secção dos materiais e métodos. O painel da esquerda corresponde à marcação da rede mitocondrial polarizada (TMRM), o painel central corresponde à marcação dos núcleos (Hoescht 33342) e o painel da direita corresponde à sobreposição das imagens do painel da esquerda e central. As imagens apresentadas têm todas a mesma ampliação e são representativas de duas experiências independentes. A barra da escala representa 10  $\mu$ m.

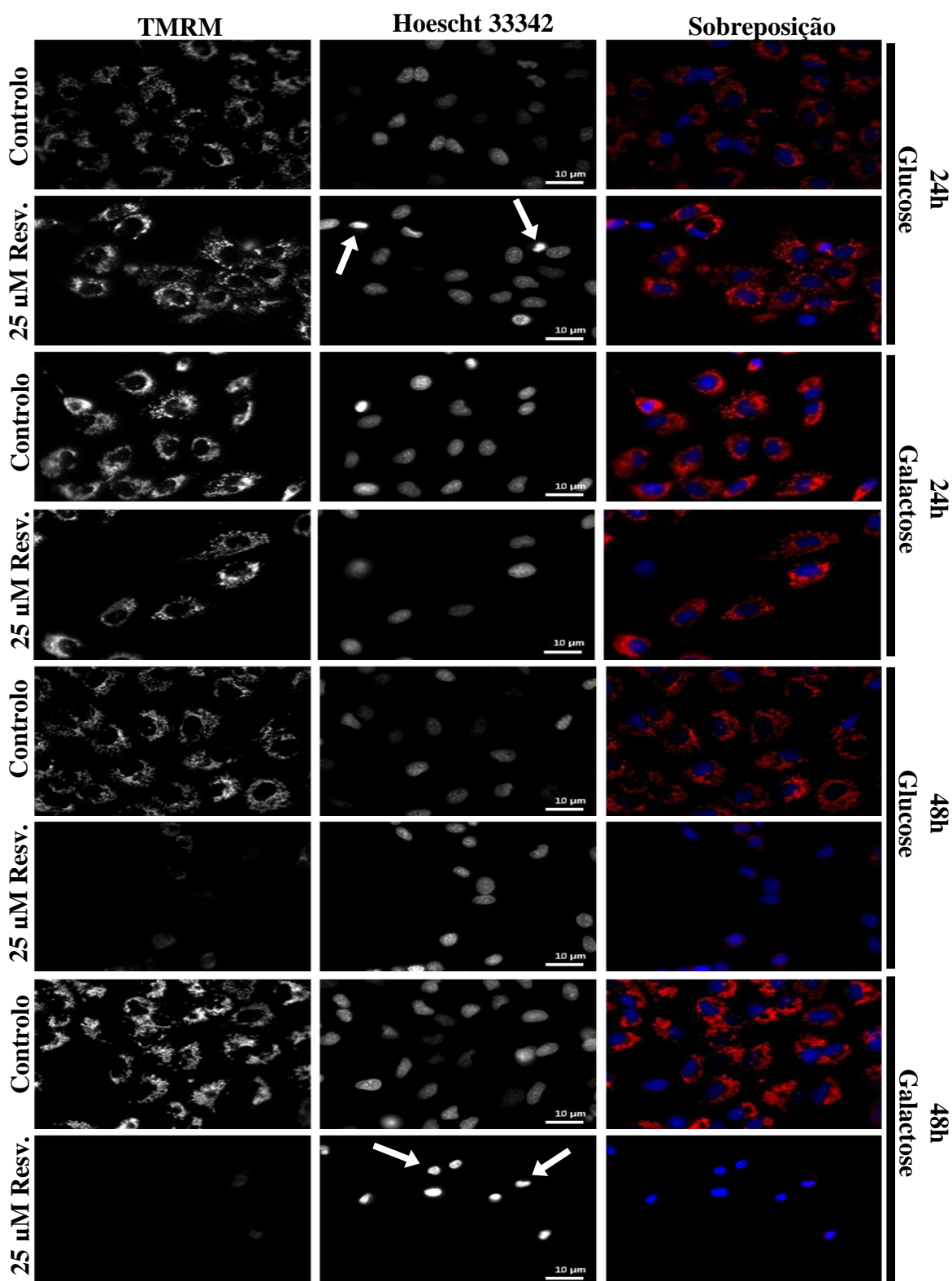


**Figura 11:** Imagens de Microscopia de Epifluorescência mostram os efeitos do resveratrol na morfologia celular e na rede mitocondrial na linha celular tumoral (MDA-MB-231). As células foram incubadas com uma concentração de resveratrol de 25 $\mu$ M durante 24h e 48h. Trinta minutos antes de terminar o período de incubação as células foram tratadas com TMRM (100 nM) e Hoescht 33342 (1mg/ml), de acordo com os procedimentos descritos na secção dos materiais e métodos. O painel da esquerda corresponde à marcação da rede mitocondrial polarizada (TMRM), o painel central corresponde à marcação dos núcleos (Hoescht 33342) e o painel da direita corresponde à sobreposição das imagens do painel da esquerda e central. As imagens apresentadas têm todas a mesma ampliação e são representativas de duas experiências independentes. A barra da escala representa 10  $\mu$ m e as setas brancas mostram núcleos apoptóticos.

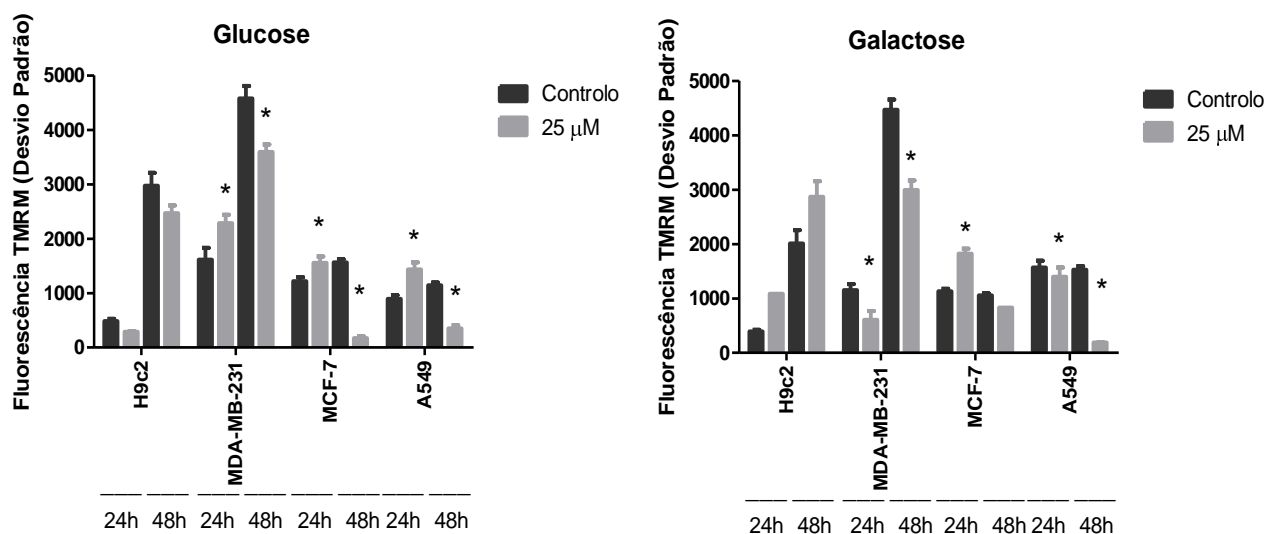


**Figura 12:** Imagens de Microscopia de Epifluorescência mostram os efeitos do resveratrol na morfologia celular e na rede mitocondrial na linha celular tumoral (MCF-7). As células foram incubadas com uma concentração de resveratrol de 25 $\mu$ M durante 24h e 48h. Trinta minutos antes de terminar o período de incubação as células foram tratadas com TMRM (100 nM) e Hoescht 33342 (1mg/ml), de acordo com os procedimentos descritos na secção dos materiais e métodos. O painel da esquerda corresponde à marcação da rede mitocondrial polarizada (TMRM), o painel central corresponde à marcação dos núcleos (Hoescht 33342) e o painel da direita corresponde à sobreposição das imagens do painel da esquerda e central. As imagens apresentadas têm todas a mesma ampliação e são representativas de duas experiências independentes. A barra de escala representa 10  $\mu$ m e as setas brancas mostram núcleos apoptóticos.





**Figura 13: Imagens de Microscopia de Epifluorescência mostram os efeitos do resveratrol na morfologia celular e na rede mitocondrial na linha celular tumoral (A549).** As células foram incubadas com uma concentração de resveratrol de 25µM durante 24h e 48h. Trinta minutos antes de terminar o período de incubação as células foram tratadas com TMRM (100 nM) e Hoescht 33342 (1mg/ml), de acordo com os procedimentos descritos na secção dos materiais e métodos. O painel da esquerda corresponde à marcação da rede mitocondrial polarizada (TMRM), o painel central corresponde à marcação dos núcleos (Hoescht 33342) e o painel da direita corresponde à sobreposição das imagens do painel da esquerda e central. As imagens apresentadas têm todas a mesma ampliação e são representativas de duas experiências independentes. A barra da escala representa 10 µm e as setas brancas mostram núcleos apoptóticos.



**Figura 14: Alterações na intensidade de fluorescência induzidas pelo resveratrol.** As células foram incubadas com uma concentração de resveratrol de 25µM durante 24h e 48h. Trinta minutos antes de terminar o período de incubação as células foram tratadas com TMRM (100 nM) e Hoechst 33342 (1mg/ml), de acordo com os procedimentos descritos na secção dos materiais e métodos. A quantificação da fluorescência do TMRM foi obtida com recurso ao programa de tratamento de imagens, ImageJ. Os dados são apresentados como média±SEM do desvio padrão da fluorescência entre o citosol das células e a marcação mitocondrial, calculadas a partir de duas experiências independentes. As amostras identificadas com (\*) indicam uma diferença significativa em relação ao grupo controlo para cada linha celular ( $p < 0,05$ ).

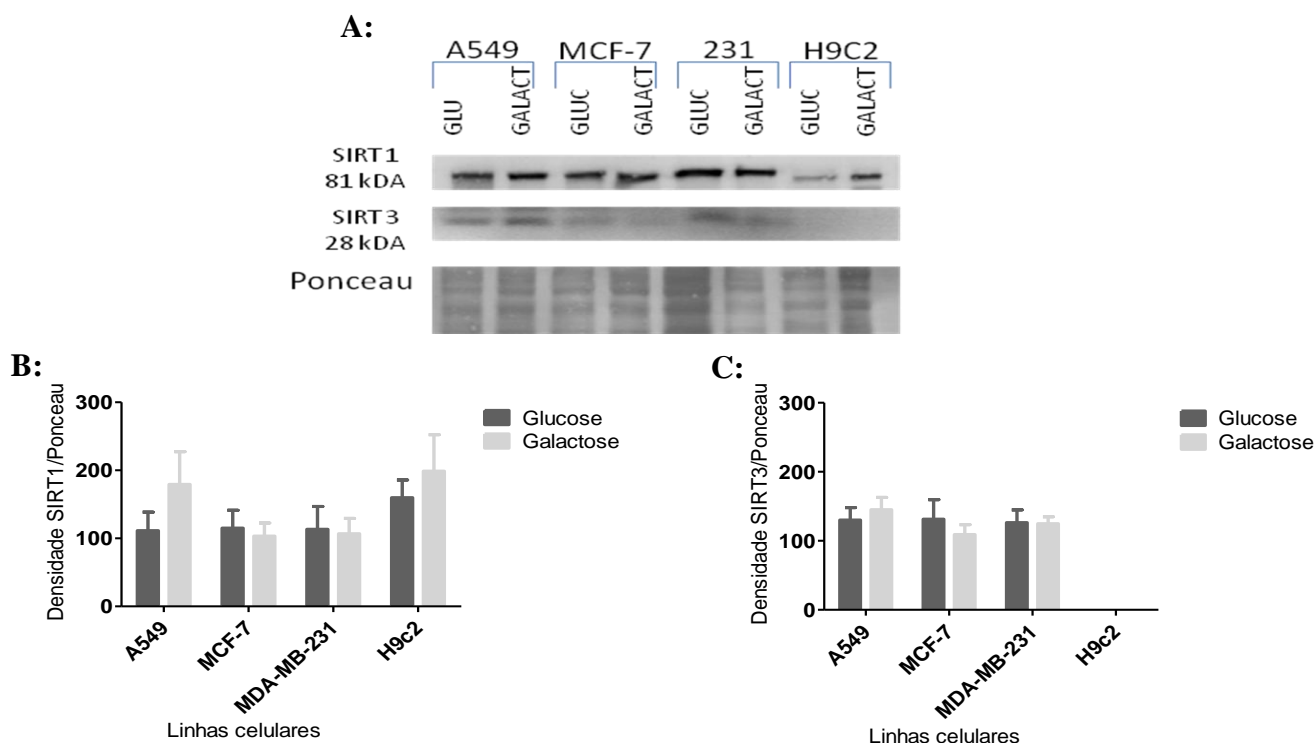
#### 4.3. Níveis de expressão da SIRT1 e da SIRT3 nas linhas celulares estudadas

Uma vez que sugerimos que o efeito do resveratrol pode ser dependente da expressão de diferentes sirtuínas, fomos avaliar a quantidade de proteína das mesmas em todas as linhas celulares estudadas. Assim, o conteúdo basal de SIRT1 e de SIRT3 nas diferentes linhas celulares tumorais (A549, MCF-7 e MDA-MB-231) e na linha não tumoral (H9c2), foi quantificado por Western Blotting. A expressão de SIRT1 nas linhas de cancro da mama, MCF-7 e MDA-MB-231 é muito semelhante (Figura 15A-B). Na linha celular A549, quando cultivadas em galactose parece haver um aumento da expressão de SIRT1, relativamente às células cultivadas em glucose, embora sem significância estatística (Figura 15-A). A mesma tendência foi observada na linha não tumoral (H9c2). É de salientar que a linha H9c2 tem, em termos de valor médio, maior conteúdo de SIRT1 do que todas as linhas celulares tumorais, independentemente das condições de crescimento (Figura 15-B)

Em relação aos níveis de expressão da SIRT3, os resultados obtidos foram bastante diferentes, uma vez que as células H9c2 não revelaram nenhum conteúdo em SIRT3



(Figura 15-A). As células A549 são as que expressam maiores níveis de SIRT3 quando expostas a condições de cultura de galactose apesar da diferença não ser estatisticamente significativa.

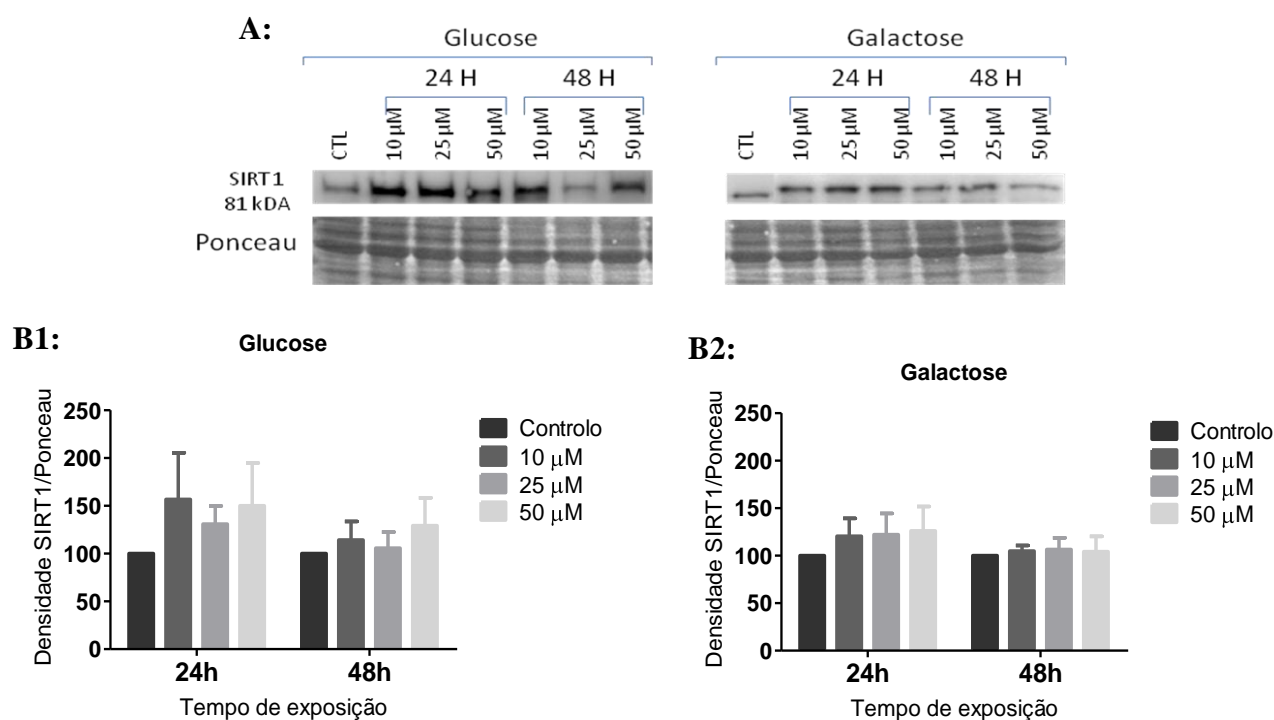


**Figura 15: Detecção por Western Blotting do conteúdo em SIRT1 e SIRT3 em extratos totais (A).** Western Blotting foi utilizado para detetar os níveis de expressão da SIRT1 e da SIRT3 em extratos totais de linhas celulares tumorais (A549, MCF-7 e MDA-MB-231) e numa linha não tumoral (H9c2), seguindo os procedimentos descritos na secção dos materiais e métodos. A marcação do conteúdo total proteico em cada poço foi confirmada usando o Ponceau; **Representação gráfica da quantificação das bandas obtidas por Western Blotting para SIRT1 (B) e SIRT3 (C).** Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM, de seis experiências independentes.

#### 4.4. Alterações nos níveis de expressão da SIRT1 e da SIRT3 pelo resveratrol

Após a avaliação das quantidades basais de SIRT1 e SIRT3 nas diferentes linhas celulares tumorais (MDA-MB-231, MCF-7 e A549) e na linha celular de cardiomioblastos (H9c2), as células foram tratadas com diferentes concentrações de resveratrol, tal como descrito na secção dos materiais e métodos, de forma a avaliar se este composto altera a quantidade proteica de SIRT1 e de SIRT3 nas diferentes linhas celulares utilizadas. Como pode ser observado na figura 16, o tratamento das células H9c2 com diferentes

concentrações de resveratrol (10, 25 e 50  $\mu\text{M}$ ) induziu um aumento da expressão da SIRT1 independentemente do tempo de exposição das células ao composto e das condições de crescimento (glucose e galactose) apesar dos resultados não terem sido estatisticamente significativos (Figura 16). Constatou-se também, que o tratamento com resveratrol não induziu aumento da quantidade de SIRT3 nas células H9c2 (resultados não apresentados).



**Figura 16: A: Detecção por Western Blotting dos níveis de expressão de SIRT1 e SIRT3 em extratos totais.** O Western Blotting foi utilizado para detetar os níveis de expressão da SIRT1 e da SIRT3 na linha não tumoral (H9c2) após o tratamento com as diferentes concentrações (10, 25 e 50  $\mu\text{M}$ ) de resveratrol, seguindo os procedimentos descritos nos materiais e métodos. A marcação do conteúdo total proteico em cada poço foi confirmada usando o Ponceau. **B: Representação gráfica da quantificação das bandas obtidas por Western Blotting em glucose (1) e galactose (2).** Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM, de seis experiências independentes. As amostras identificadas com (\*) indicam uma diferença significativa em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ).

Em relação às células MDA-MB-231, os resultados mostram um aumento da expressão de SIRT1 nas concentrações de 10 e 25  $\mu\text{M}$  de resveratrol no tratamento de 24h, quando estas foram cultivadas em glucose, apesar de o desvio padrão impedir que se atinja uma diferença estatisticamente significativa. (Figura 17-B1). Quando as células foram cultivadas em galactose verificou-se um ligeiro decréscimo para 25  $\mu\text{M}$  de resveratrol,

quando tratadas durante 24h (Figura 17-B1). Em galactose, houve também um decréscimo, apesar das diferenças não atingirem a significância estatística (Figura 17-B2).

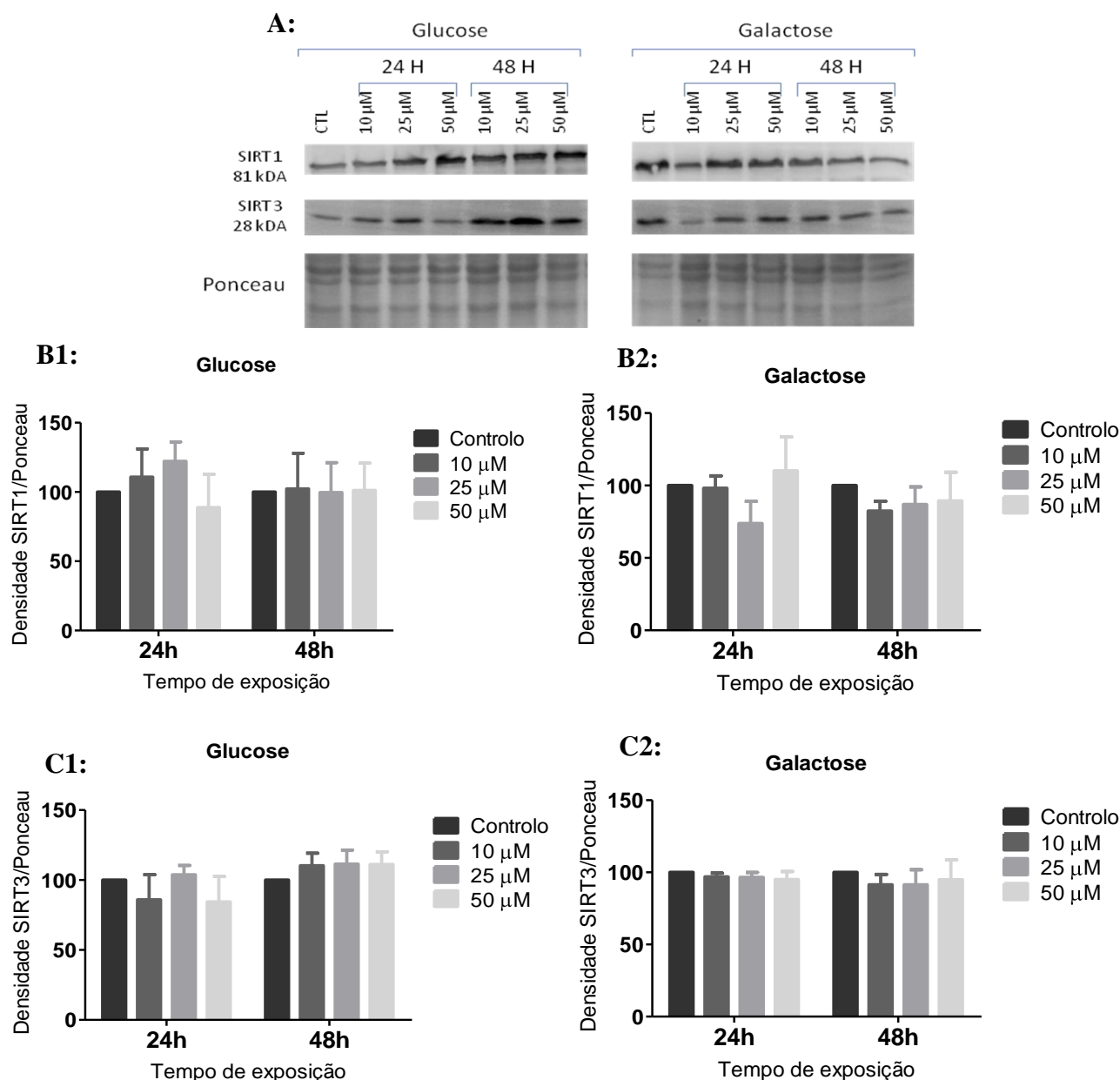
Os níveis de expressão da SIRT3 nas células MDA-MB-231 cultivadas em glucose foram ligeiramente aumentados para todas as concentrações de resveratrol para o tempo de exposição maior (48h). Por outro lado, a exposição destas células a 10 e 50  $\mu$ M durante 24h em meio com glucose, bem como o tratamento com as várias concentrações de resveratrol (10, 25 e 50  $\mu$ M) em meio de galactose durante 24h e 48h induziram uma diminuição da expressão de SIRT3 (Figura 17-C2).

Em relação às células MCF-7, quando cultivadas em glucose verificou-se um aumento da expressão de SIRT1 independente da concentração de resveratrol com que as células foram tratadas, tanto para 24h de exposição ao resveratrol como às 48h, apesar da magnitude do desvio padrão não permitir uma significância estatística (Figura 18-B1). Quando cultivadas em galactose, as alterações no conteúdo de SIRT1 não tiveram diferenças estatísticas (Figura 18-B2).

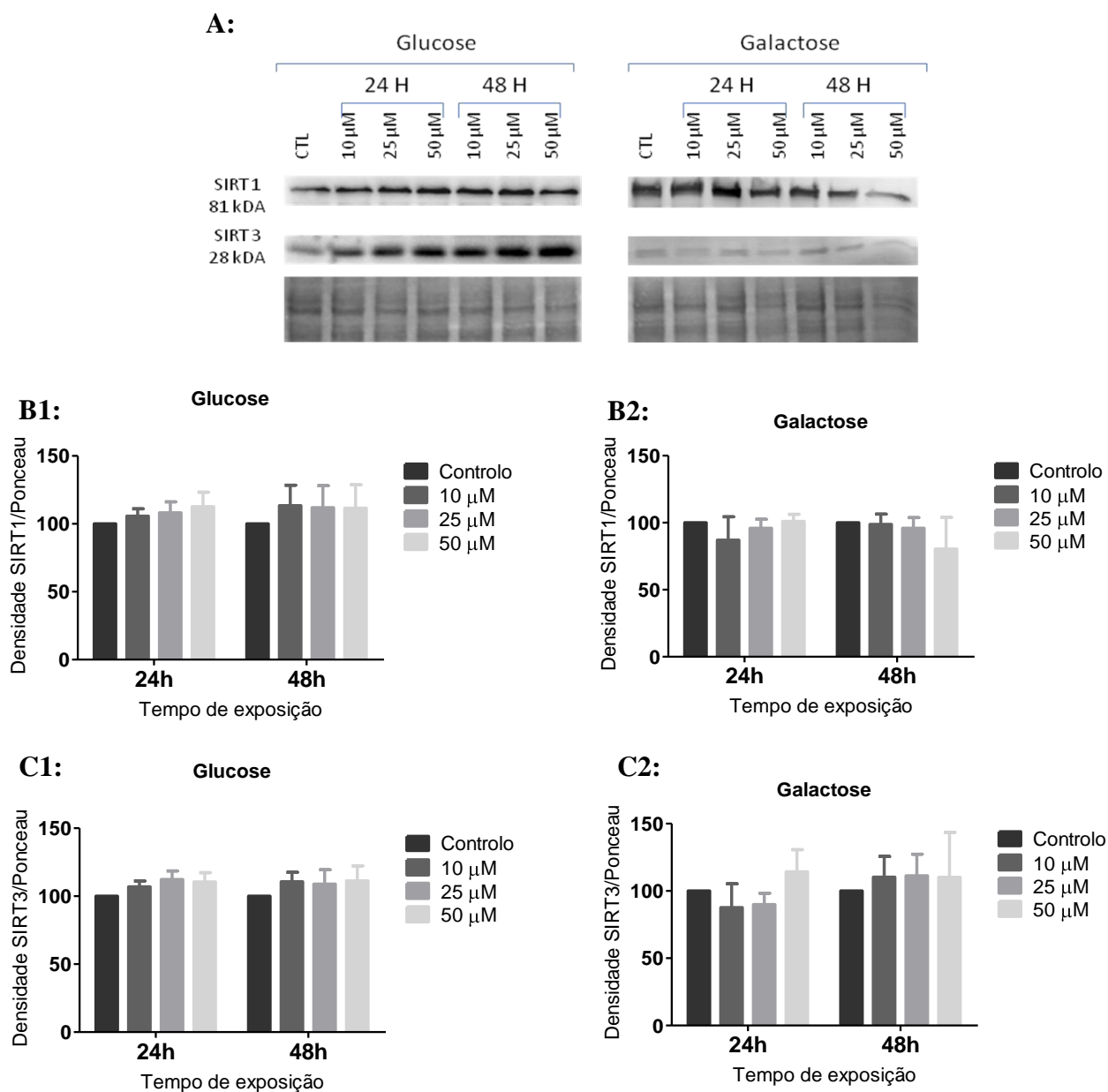
A expressão de SIRT3 nas células cultivadas em glucose também aumentou, apesar de não estatisticamente significativo, tanto às 24h de exposição ao composto como às 48h (Figura 18-C1). Quando as células cresceram em galactose, verificou-se um aparente aumento dos níveis de SIRT3 para as 48h (Figura 18-C2).

Nas células A549 cultivadas em glucose, a expressão da SIRT1 aumentou com o aumento da concentração de resveratrol durante 24h, enquanto para tempos de exposição superiores (48h) a exceção é quando as células foram sujeitas à concentração mais elevada (50  $\mu$ M) (Figura 19-B1). Nas células cultivadas em galactose, o tratamento com resveratrol induziu uma diminuição da expressão de SIRT1, diminuição essa que para o tempo de 48h foi dependente da concentração de resveratrol utilizada, apesar de não ser estatisticamente significativa.

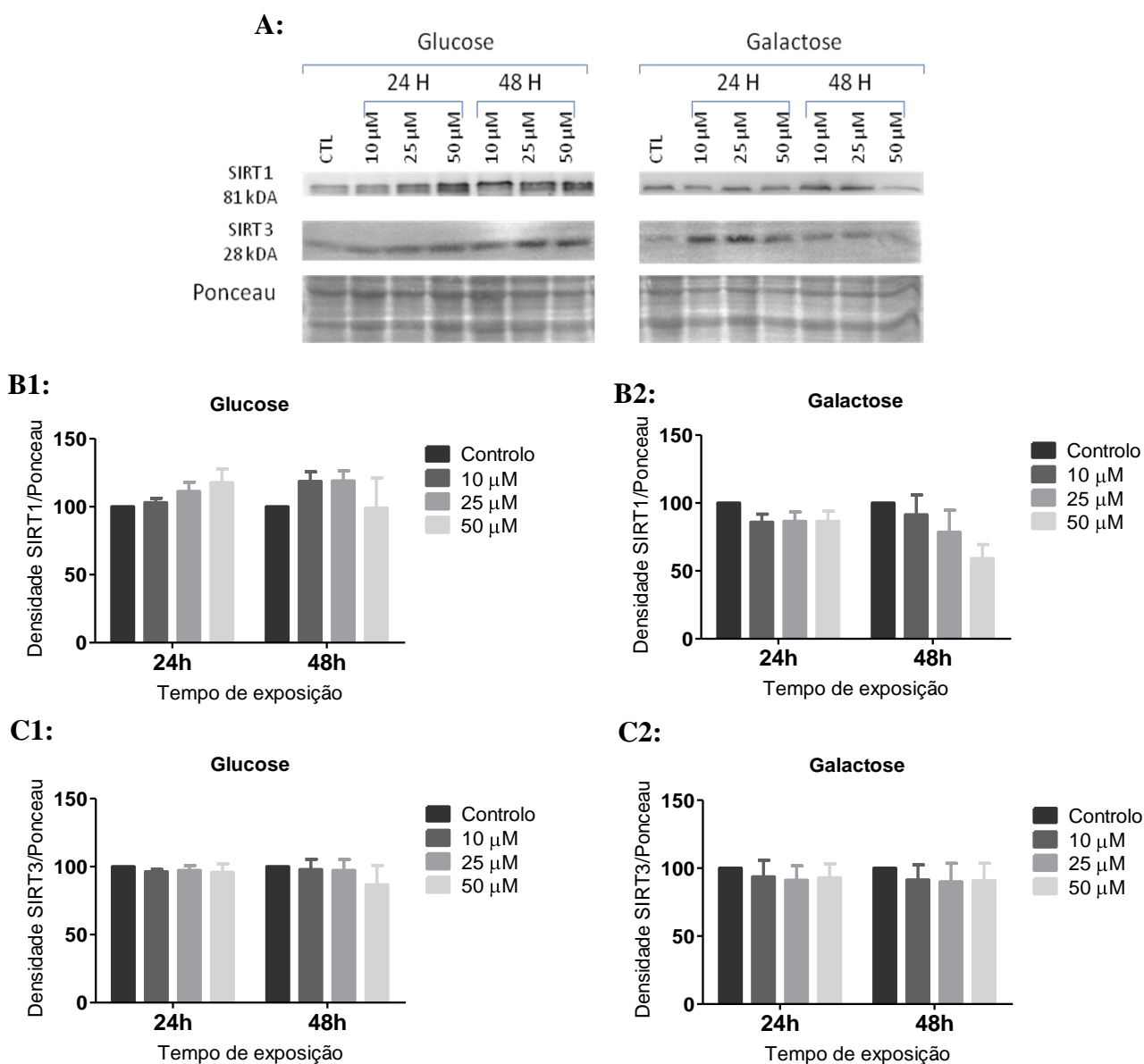
Nesta linha celular, não houve alterações significativas em termos do conteúdo de SIRT3, apesar de um decréscimo aparente (Figura 19-C1 e C2).



**Figura 17: Detecção por Western Blotting dos níveis de expressão de SIRT1 e SIRT3 em extratos totais.** O Western Blotting foi utilizado para detetar os níveis de expressão da SIRT1 e da SIRT3 na linha tumoral (MDA-MB-231) após o tratamento com as diferentes concentrações (10, 25 e 50  $\mu$ M) de resveratrol, seguindo os procedimentos descritos nos materiais e métodos. A marcação do conteúdo total proteico em cada poço foi confirmada usando o Ponceau. **Representação gráfica da quantificação das bandas de SIRT1 (B) e SIRT3 (C) obtidas por Western Blotting em 1: glucose e 2: galactose.** Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM, de seis experiências independentes. As amostras identificadas com (\*) indicam uma diferença significativa em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ).



**Figura18: Detecção por Western Blotting dos níveis de expressão de SIRT1 e SIRT3 em extratos totais.** O Western Blotting foi utilizado para detetar os níveis de expressão da SIRT1 e da SIRT3 na linha tumoral (MCF-7) após o tratamento com as diferentes concentrações (10, 25 e 50  $\mu$ M) de resveratrol, seguindo os procedimentos descritos nos materiais e métodos. A marcação do conteúdo total proteico em cada poço foi confirmada usando o Ponceau. **Representação gráfica da quantificação das bandas de SIRT1 (B) e SIRT3 (C) obtidas por Western Blotting em 1: glucose e 2: galactose.** Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM, de seis experiências independentes. As amostras identificadas com (\*) indicam uma diferença significativa em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 19: Detecção por Western Blotting dos níveis de expressão de SIRT1 e SIRT3 em extratos totais.** O Western Blotting foi utilizado para detetar os níveis de expressão da SIRT1 e da SIRT3 na linha tumoral (A549) após o tratamento com as diferentes concentrações (10, 25 e 50  $\mu$ M) de resveratrol, seguindo os procedimentos descritos nos materiais e métodos. A marcação do conteúdo total proteico em cada poço foi confirmada usando o Ponceau. **Representação gráfica da quantificação das bandas de SIRT1 (B) e SIRT3 (C) obtidas por Western Blotting em 1: glucose e 2: galactose.** Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM, de seis experiências independentes. As amostras identificadas com (\*) indicam uma diferença significativa em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ).

## CAPÍTULO 5

---

## DISCUSSÃO

O resveratrol é um composto natural que tem mostrado ser eficaz na inibição da proliferação celular de diferentes linhas celulares tumorais, e prevenindo o desenvolvimento tumoral nos diferentes estágios da carcinogénese (Holian et al. 2002). Vários autores têm demonstrado que o resveratrol inibe o crescimento de inúmeros tipos de cancro, incluindo cancro da pele (Athar et al. 2007), do estômago (Holian et al. 2002), do cólon (Vanamala et al. 2011), da próstata, do pâncreas, da tiroide, da cabeça, do pescoço, dos ovários, de cancro cervical, melanoma e de cancros linfoides e mieloides (Aggarwal et al. 2004). Os dados da literatura permitiram-nos desenvolver a hipótese de que o efeito citotóxico do resveratrol em células tumorais depende diretamente da quantidade intrínseca da SIRT1 e SIRT3. Uma vez que ambas as sirtuínas modulam o metabolismo mitocondrial e celular (Verdin et al. 2010), seria de esperar que uma perturbação do metabolismo em células tumorais, por si já alterado (Moreno-Sanchez et al. 2007), possa ter impacto ao nível da sobrevivência celular. No presente estudo, observou-se que o resveratrol apresenta um efeito anti-proliferativo nos dois tipos de linhas celulares tumorais de cancro da mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e em cancro de pulmão (A549). Para concentrações de 50  $\mu\text{M}$  de resveratrol, todas as linhas celulares sofreram uma inibição da proliferação independentemente do tempo de exposição ao composto (Figura 9). Estudos realizados anteriormente com linhas celulares de cancro da mama apresentaram efeitos concordantes com os obtidos no presente estudo. Foi demonstrado que o resveratrol inibe o crescimento celular mediado pelo recetor Fas em células T47D (Athar et al. 2007). Para concentrações de resveratrol superiores a 1  $\mu\text{M}$ , o crescimento de células MCF-7 foi inibido pela supressão do efeito proliferativo do 17-beta-estradiol (E2). Também em células de cancro da mama com propriedades mais invasivas, MDA-MB-435 e MDA-MB-468, o resveratrol demonstrou inibir o crescimento celular (Athar et al. 2007). Em estudos *in vivo*, doses de resveratrol de 25mg/kg por dia, atrasaram o desenvolvimento do tumor e a angiogénese e causaram apoptose (Athar et al. 2007). Whyte et al. (2007) também demonstraram que o resveratrol em concentrações de 1-100  $\mu\text{mol/l}$  é eficaz na inibição do crescimento de linhas celulares tumorais de cancro do pulmão, incluindo A549, NCI H460 e NCI H23. Nesse mesmo estudo verificou-se o sucesso na inibição do crescimento celular dessas células a partir da concentração de 25  $\mu\text{mol/l}$  de resveratrol. Em células A549, este efeito anti-proliferativo tem sido associado à supressão da fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb) e da proteína ativadora (AP-1) (Whyte et al. 2007). Para além disso, os efeitos anti-

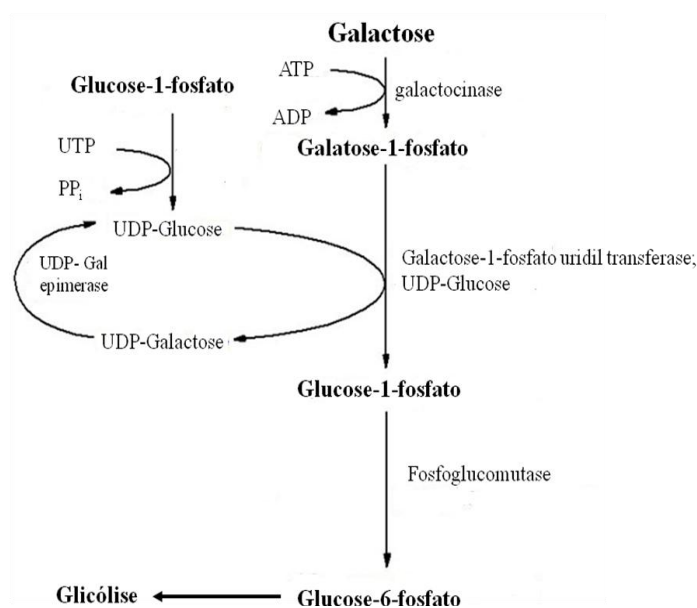


proliferativos em células cancerígenas parecem estar também relacionados com o potencial do resveratrol em bloquear o ciclo celular, na sobre-regulação da p21 Cip/WAF1, da p53 e da Bax, na regulação de ciclina D1 e E, na regulação de Bcl-2 e Bcl-xL, na ativação da caspase-3 e na inibição de diversos fatores de transcrição, incluindo NF- $\kappa$ B, JNK, Akt e COX-2 (Aggarwal et al. 2004).

Apesar de se ter verificado a inibição da proliferação celular em células cancerígenas, verificou-se também a inibição em células não tumorais de coração embrionário de rato, H9c2 (Figura 9A). Estes resultados estão em concordância com dados da literatura que demonstram a inibição do crescimento das células H9c2 quando sujeitas a concentrações de 30-120  $\mu$ M de resveratrol durante 5 dias. No entanto, deve salientar-se que esse estudo demonstrou que apesar da inibição do crescimento destas células, o resveratrol não induziu qualquer tipo de lesões nas mesmas (Leong et al. 2007). Este facto também foi comprovado no presente estudo através da técnica de microscopia de epifluorescência (Figura 10). O efeito do resveratrol pode estar assim relacionado com uma inibição do ciclo celular e não por indução de danos celulares que resultam na apoptose.

Todas as experiências deste estudo foram realizadas em duas condições de crescimento diferentes, nomeadamente em meio com glucose e num meio sem glucose mas com galactose (contendo glutamina/ piruvato). As células foram cultivadas neste segundo meio com o intuito de as forçar a utilizar exclusivamente a fosforilação oxidativa para a produção de energia (Marroquin et al. 2007). A galactose é uma hexose que difere da glucose apenas no grupo hidroxilo na posição 4 do carbono. A maioria das vezes este hidrato de carbono está presente como uma mistura de  $\alpha$ -D-galactose e  $\beta$ -D-galactose. Uma vez no interior das células a  $\beta$ -D-galactose é separada através da ação da enzima mutarotase em  $\alpha$ -D-galactose, a qual é posteriormente convertida em galactose-1-fosfato pela enzima galactocinase (Rossignol et al. 2004; Lai et al. 2009). Na presença de galactose-1-fosfato uridiltransferase, a galactose-1-fosfato reage com a UDP-glucose para formar UDP-galactose e glucose-1-fosfato. Esta última pode entrar na via glicolítica ou reagir com a UTP formando novamente UDP-Glucose (Figura 20). Devido a estas reações a galactose não é um nutriente essencial (Rossignol et al. 2004; Lai et al. 2009). No entanto, a maioria das células contêm galactocinase pouco ativa, o que na ausência de glucose, impede a utilização da galactose para produzir energia, servindo apenas como fonte de carbono. A presença de glutamina no meio, leva a que as células tumorais a

metabolizem em glutamato, que pode ser excretado ou utilizado no ciclo do Krebs, levando posteriormente à produção de energia através do processo de fosforilação oxidativa (Mates et al. 2009). Um resultado interessante obtido foi o facto de o resveratrol ter demonstrado ser mais eficaz na inibição do crescimento das células quando estas crescem em meio com glucose do que em meio com galactose (Figura 9). Vários autores têm proposto que as células cancerígenas apresentam propriedades bioenergéticas anormais caracterizadas pela produção de ATP predominantemente através da glicólise aeróbica em vez da utilização maioritária da fosforilação oxidativa (Bellance et al. 2009). Kueck et al. (2007) mostraram que o resveratrol inibe a glicólise aeróbia em várias linhas celulares de cancro dos ovários. O resveratrol inibe a absorção de glucose e a produção de lactato e regula a atividade de moléculas de sinalização que controlam o metabolismo de hidratos de carbono, incluindo a proteína Akt (Kueck et al. 2007; Iqbal e Bamezai 2012). Esses dados conjuntamente com os resultados do presente trabalho, indicaram a citotoxicidade do resveratrol tem uma componente relacionada com a glicólise.



**Figura 20: Representação esquemática da via metabólica da galactose.** A galactose é metabolizada em Glucose-6-fosfato, que é posteriormente utilizada na via glicolítica para produção de energia, sob a forma de ATP. A maioria das células não metaboliza a galactose na ausência de glucose, possuindo também galactocinase pouco ativa. Adaptado de Lai et al. (2009).

Os resultados obtidos nos ensaios da proliferação celular foram concordantes com os obtidos através da microscopia de epifluorescência, uma vez que nesta última o

tratamento de todas as linhas celulares com a concentração de 25  $\mu\text{M}$  de resveratrol induziu alterações morfológicas e alterações na rede mitocondrial de todas as linhas tumorais, culminando na morte celular (Figura 11 a 13). Apesar das células não tumorais H9c2 apresentarem uma diminuição da proliferação celular quando sujeitas a concentração de 25  $\mu\text{M}$  de resveratrol, a análise por microscopia de epifluorescência permitiu confirmar a ausência de alterações na morfologia e na rede mitocondrial das mesmas (Figura 10). É sabido que alterações na integridade e na função mitocondrial podem ter um papel de extrema importância na cascata de sinalização que culmina na apoptose (Tak et al. 2012). A perda do potencial de membrana está associada à apoptose e pode preceder a libertação de citocromo c e Smac/Diablo mitocondrial levando a ativação da caspase-9 e consequente ativação da caspase-3. A ativação de proteínas nucleares leva à fragmentação do DNA e condensação nuclear (van Ginkel et al. 2008). O processo apoptótico pode levar também à formação de bolhas na membrana (van Ginkel et al. 2008). Ma, Tian et al. (2007) determinaram que 100  $\mu\text{M}$  de resveratrol induzia a apoptose e a disfunção mitocondrial em células de hepatoma humano (HepG2), a qual era dependente da indução da abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial e de um aumento dos níveis intracelulares de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Foi determinado que o resveratrol alterava o potencial de membrana mitocondrial e consequentemente ocorria a libertação de citocromo c. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos similares com as células de cancro da mama, MDA-MB-231 e MCF-7 (Sareen et al. 2007). Um resultado interessante foi o facto de o desvio padrão de fluorescência parecer aumentar para alguns tratamentos com resveratrol (exemplo: MDA-MB-231, às 24h em meio com glucose ou MCF-7, 24h em meio com galactose). Por análise das imagens de microscopia não é fácil perceber porque isto aconteceu e se realmente houve um aparente aumento do potencial de membrana. Se real, este aumento pode estar relacionado com várias causas possíveis incluindo a inibição da síntese de ATP ou alterações da condutividade de ambas as membranas mitocondriais que se sabem ocorrer durante o processo de apoptose (Gogvadze et al. 2009). Igualmente interessante foi o facto de o mesmo fenómeno ter acontecido em células H9c2, nomeadamente em meio em galactose. Claramente, mais trabalho é necessário para perceber esse fenómeno.

Neste estudo consideramos também que a diferente ação citotóxica do resveratrol em várias linhas celulares tumorais poderia estar também relacionada com uma diferente

quantidade basal e posterior alteração do conteúdo de SIRT1 e SIRT3. A análise dos níveis proteicos de SIRT1 e SIRT3 nas várias linhas celulares, quer na ausência, quer na presença de resveratrol resultou em resultados interessantes, sendo que a sua importância é limitada pela falta de significância estatística. Tal deveu-se a um desvio padrão maior do que o esperado e que será minimizado pela realização de experiências adicionais. Desta forma começamos por analisar quais os níveis basais de SIRT1 e SIRT3. Os resultados obtidos permitiram concluir que as maiores quantidades de SIRT1, em termos apenas de valor médio, estão presentes nas células H9c2, independentemente do meio de cultivo utilizado, seguidamente das células A549 e por fim as duas linhas celulares de cancro da mama, que apresentam uma expressão de SIRT1 muito próxima entre si (Figura 15-B). Curiosamente, as células H9c2 não expressam SIRT3. Contrariamente aos resultados obtidos para as células H9c2 neste estudo, experiências *in vivo* mostram uma elevada expressão de SIRT3 em tecidos metabolicamente ativos, tais como rins, fígado, cérebro e coração (Palacios et al. 2009). Não é clara a razão da não existência (ou muito baixa expressão) de SIRT3 nesta linha celular. Será interessante verificar se algum outro tipo de sirtuina mitocondrial pode substituir a SIRT3 na sua função de regulação do metabolismo mitocondrial.

Após o tratamento com resveratrol, foi possível verificar que a quantidade de SIRT1 aumentou nas células H9c2 em todas as condições de cultura e independentemente do tempo de exposição ao composto. De uma forma geral quando as células MDA-MB-231, MCF-7 e A549 foram cultivadas em meio de glucose, verificou-se um ligeiro aumento da expressão da SIRT1 (Figuras 16-B1, 17-B1 e 18-B1). Sendo que quando as células foram cultivadas em galactose ocorrem algumas variações na expressão da SIRT1, dependendo da concentração e do tempo de tratamento com resveratrol (Figuras 16-B2, 17-B2, 18-B3). O aumento na expressão de SIRT1 está concordante com as alterações morfológicas e na rede mitocondrial que se obteve através da microscopia de epifluorescência (Figura 11 a 13), bem como a diminuição da proliferação celular, indo também ao encontro de resultados obtidos em estudos anteriores (Deng 2009). As sirtuinas têm um papel importante na tumorigénese (McGuinness et al. 2011). Verificou-se a elevada expressão da SIRT1 em alguns tipos de cancro, incluindo cancro da próstata, leucemia mieloide aguda, cancro do colón e cancro da pele. Com base nessa elevada expressão de SIRT1 em vários tipos de cancro, esta proteína parece ter um efeito como promotora de tumor (Liu et al. 2009). No entanto, a SIRT1 parece ter um papel duplo na

transformação maligna, de acordo com o seu nível de expressão e tecido onde se encontra (Fang e Nicholl 2011), sendo que a sua inativação resulta em tumorigénese em vários tipos de tumores (Deng, 2009). Assim, o resveratrol pode atuar de uma forma positiva sobre a SIRT1, aumentando a sua expressão. Consequentemente a SIRT1 inibe a expressão e/ou atividade de vários oncogenes, NF-kB,  $\beta$ -catenina e survivina, levando a uma proliferação celular reduzida e à supressão tumoral (Deng 2009).

Neste trabalho foi ainda demonstrado que a expressão de SIRT1 em células não tumorais (H9c2) é ligeiramente superior às células tumorais usadas. Estudos anteriores com células H9c2 tratadas com concentrações entre 10 e 100 $\mu$ M de resveratrol durante 24h, demonstraram um aumento da expressão de SIRT1 (Chen et al. 2009). Estes dados podem não só mostrar o papel do resveratrol na tumorigénese, bem como o efeito cardioprotetor que parece estar associado a este composto.

Em relação à SIRT3, os resultados obtidos parecem indicar que o resveratrol poderá aumentar a quantidade daquela proteína em extratos totais de algumas das linhas celulares estudadas, nomeadamente MCF-7. Curiosamente, o resveratrol não teve qualquer efeito nos níveis celulares de SIRT3. De momento não conseguimos prever qual a consequência de um possível aumento da SIRT3 causado pelo resveratrol nas várias linhas celulares tumorais investigadas. Sabe-se que a SIRT3 regula várias vias metabólicas mitocondriais e estimula a produção de ATP pela mitocôndria (Verdin et al. 2010). Assim, não seria de todo descabido pensar que uma ativação da função mitocondrial em linhas celulares tumorais com metabolismo alterado poderia resultar num desequilíbrio redox e culminar na indução da morte celular.

Os resultados indicam também que o aumento da expressão das sirtuínas pelo resveratrol é mais acentuado quando as células são cultivadas em meio com glucose do que em galactose, tal como referido anteriormente para as outras técnicas realizadas. Tal facto pode ser justificado, através do efeito regulador essencial que a SIRT3 exerce no efeito de Warburg. Este efeito ocorre através da reprogramação do fator de indução de hipóxia (HIF-1), um fator de transcrição que controla a expressão de genes que atuam na glicólise. Por outro lado a diminuição dos níveis de SIRT3 levam à produção de ROS e a estabilização de HIF-1 (Finley et al. 2011). A SIRT3 parece ser pouco expressa em cancros da mama humanos e a sua perda correlaciona-se com a regulação positiva de genes alvo de HIF-1. A

sobre-expressão de SIRT3 reprime a glicólise e a proliferação de células de cancro da mama, levando à supressão tumoral (Finley et al. 2011).

## CAPÍTULO 6

---

# CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

De uma maneira geral, o trabalho realizado ao longo do presente estudo corrobora com a ideia de que o resveratrol é um composto com características promissoras na terapia do cancro. Este composto poderá ser um bom complemento da quimioterapia ou até mesmo ser uma alternativa no desenvolvimento de terapias menos agressivas. No presente trabalho são evidentes as alterações morfológicas e na rede mitocondrial e consequentemente, a inibição da proliferação celular das células cancerígenas quando sujeitas a tratamento com resveratrol. Os resultados por Western Blotting, apesar de preliminares, demonstraram que o resveratrol influencia a expressão da SIRT1 e da SIRT3, potencializando os efeitos de inibição do crescimento celular em células tumorais. No entanto ainda é não é possível correlacionar o efeito do resveratrol em várias linhas celulares tumorais com alterações nos níveis proteicos de SIRT1 e SIRT3. Contudo, parece claro que linhas celulares tumorais de origens diferentes respondem diferentemente ao tratamento com resveratrol, no que respeita à modulação dos dois tipos de sirtuinas.

Contudo trabalhos futuros são necessários para clarificar e evidenciar o mecanismo dependente da expressão das sirtuinas, de forma a elucidar o efeito anti-tumoral do resveratrol e de que forma este efeito varia com o tipo de tumor.



## CAPÍTULO 7

---

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal, B. B., A. Bhardwaj, R. S. Aggarwal, N. P. Seeram, S. Shishodia e Y. Takada (2004). "Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies." Anticancer Research **24**(5A): 2783-2840.
- Aggarwal, B. B. e S. Shishodia (2006). "Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer." Biochemical Pharmacology **71**(10): 1397-1421.
- Athar, M., J. H. Back, X. Tang, K. H. Kim, L. Kopelovich, D. R. Bickers e A. L. Kim (2007). "Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention." Toxicology and Applied Pharmacology **224**(3): 274-283.
- Baltzer, C., S. K. Tiefenbock e C. Frei (2010). "Mitochondria in response to nutrients and nutrient-sensitive pathways." Mitochondrion **10**(6): 589-597.
- Bellance, N., G. Benard, F. Furt, H. Begueret, K. Smolkova, E. Passerieux, J. P. Delage, J. M. Baste, P. Moreau e R. Rossignol (2009). "Bioenergetics of lung tumors: Alteration of mitochondrial biogenesis and respiratory capacity." International Journal of Biochemistry & Cell Biology **41**(12): 2566-2577.
- Bradford, M. M. (1976). "Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**(1-2): 248-254.
- Bursch, W. (2001). "The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death." Cell Death and Differentiation **8**(6): 569-581.
- Cardone, R. A., V. Casavola e S. J. Reshkin (2005). "The role of disturbed pH dynamics and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in metastasis." Nature Reviews Cancer **5**(10): 786-795.
- Chen, C. J., W. Yu, Y. C. Fu, X. Wang, J. L. Li e W. Wang (2009). "Resveratrol protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis through the SIRT1-FoxO1 pathway." Biochemical and Biophysical Research Communications **378**(3): 389-393.
- Chen, J. Q., P. P. Cammarata, C. P. Baines e J. D. Yager (2009). "Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications." Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research **1793**(10): 1540-1570.
- Chen, Y. N., C. C. Cheng, C. T. Yu, S. J. Chou, H. C. Chen e S. L. Hsu (2005). "Involvement of Intrinsic and Extrinsic Apoptotic Pathways in Baicalein-Induced Apoptosis in Human Hepatoma Hep3B Cells." Journal of Cancer Molecules **1**(1): 37-45.

- Cho, D. I., N. Y. Koo, W. J. Chung, T. S. Kim, S. Y. Ryu, S. Y. Im e K. M. Kim (2002). "Effects of resveratrol-related hydroxystilbenes on the nitric oxide production in macrophage cells: structural requirements and mechanism of action." Life Sciences **71**(17): 2071-2082.
- Chung, S., H. Yao, S. Caito, J.-W. Hwang, G. Arunachalam e I. Rahman (2010). "Regulation of SIRT1 in cellular functions: Role of polyphenols." Archives of Biochemistry and Biophysics **501**(1): 79-90.
- Clarke, P. G. H. (1990). "Developmental Cell-death: Morphological diversity and multiple mechanisms." Anatomy and Embryology **181**(3): 195-213.
- Cottart, C.-H., V. Nivet-Antoine, C. Laguillier-Morizot e J.-L. Beaudeux (2010). "Resveratrol bioavailability and toxicity in humans." Molecular Nutrition & Food Research **54**(1): 7-16.
- Dang, C. V. e G. L. Semenza (1999). "Oncogenic alterations of metabolism." Trends in Biochemical Sciences **24**(2): 68-72.
- Deng, C. X. (2009). "SIRT1, Is It a Tumor Promoter or Tumor Suppressor?" International Journal of Biological Sciences **5**(2): 147-152.
- Dietrich, M. O. e T. L. Horvath (2010). "The role of mitochondrial uncoupling proteins in lifespan." Pflügers Archiv-European Journal of Physiology **459**(2): 269-275.
- Dong, Z. G. (2003). "Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol." Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **523**: 145-150.
- Donmez, G. e L. Guarente (2010). "Aging and disease: connections to sirtuins." Aging Cell **9**(2): 285-290.
- Dudkina, N. V., R. Kouril, K. Peters, H. P. Braun e E. J. Boekema (2010). "Structure and function of mitochondrial supercomplexes." Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics **1797**(6-7): 664-670.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: A review of programmed cell death." Toxicologic Pathology **35**(4): 495-516.
- Fang, Y. J. e M. B. Nicholl (2011). "Sirtuin 1 in malignant transformation: Friend or foe?" Cancer Letters **306**(1): 10-14.
- Fatehi-Hassanabad, Z., C. B. Chan e B. L. Furman (2010). "Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes." European Journal of Pharmacology **636**(1-3): 8-17.

- Fearon, E. R. (1997). "Human cancer syndromes: Clues to the origin and nature of cancer." Science **278**(5340): 1043-1050.
- Fernie, A. R., F. Carrari e L. J. Sweetlove (2004). "Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport." Current Opinion in Plant Biology **7**(3): 254-261.
- Fink, S. L. e B. T. Cookson (2005). "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells." Infection and Immunity **73**(4): 1907-1916.
- Finley, L. W. S., A. Carracedo, J. Lee, A. Souza, A. Egia, J. W. Zhang, J. Teruya-Feldstein, P. I. Moreira, S. M. Cardoso, C. B. Clish, P. P. Pandolfi e M. C. Haigis (2011). "SIRT3 Opposes Reprogramming of Cancer Cell Metabolism through HIF1 alpha Destabilization." Cancer Cell **19**(3): 416-428.
- Frye, R. A. (2000). "Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins." Biochemical and Biophysical Research Communications **273**(2): 793-798.
- Fulda, S. (2010). "Exploiting mitochondrial apoptosis for the treatment of cancer." Mitochondrion **10**(6): 598-603.
- Gatenby, R. A. e R. J. Gillies (2004). "Why do cancers have high aerobic glycolysis?" Nature Reviews Cancer **4**(11): 891-899.
- Ghobrial, I. M., T. E. Witzig e A. A. Adjei (2005). "Targeting apoptosis pathways in cancer therapy." Ca-a Cancer Journal for Clinicians **55**(3): 178-194.
- Gogvadze, V., S. Orrenius e B. Zhivotovsky (2009). "Mitochondria as targets for cancer chemotherapy." Seminars in Cancer Biology **19**(1): 57-66.
- Green, D. R., L. Galluzzi e G. Kroemer (2011). "Mitochondria and the Autophagy-Inflammation-Cell Death Axis in Organismal Aging." Science **333**(6046): 1109-1112.
- Grivicich, I., A. Regner e A. B. Rocha (2007). "Apoptosis: Programmed Cell Death." Revista Brasileira de Cancerologia **53**(3): 335-343.
- Haigis, M. C. e L. P. Guarente (2006). "Mammalian sirtuins - emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction." Genes & Development **20**(21): 2913-2921.
- Halestrap, A. (2003). "The role of mitochondria in cell death." Endocrine Abstracts **5** 13

- Hanahan, D. e R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hao, C. M. e V. H. Haase (2010). "Sirtuins and Their Relevance to the Kidney." Journal of the American Society of Nephrology **21**(10): 1620-1627.
- Hebert, S. L., I. R. Lanza e K. S. Nair (2010). "Mitochondrial DNA alterations and reduced mitochondrial function in aging." Mechanisms of Ageing and Development **131**(7-8): 451-462.
- Holian, O., S. Wahid, M. J. Atten e B. M. Attar (2002). "Inhibition of gastric cancer cell proliferation by resveratrol: role of nitric oxide." American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology **282**(5): G809-G816.
- Huang, C. S., W. Y. Ma, A. Goranson e Z. G. Dong (1999). "Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway." Carcinogenesis **20**(2): 237-242.
- Hughes, L., C. Malone, S. Chumsri, A. M. Burger e S. McDonnell (2008). "Characterisation of breast cancer cell lines and establishment of a novel isogenic subclone to study migration, invasion and tumourigenicity." Clinical & Experimental Metastasis **25**(5): 549-557.
- Iqbal, M. A. e R. N. K. Bamezai (2012). "Resveratrol Inhibits Cancer Cell Metabolism by Down Regulating Pyruvate Kinase M2 via Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin." PLoS One **7**(5): 1-8.
- Kasibhatla, S. e B. Tseng (2003). "Why target apoptosis in cancer treatment?" Molecular Cancer Therapeutics **2**(6): 573-580.
- Kelly, G. (2010). "A Review of the Sirtuin System, its Clinical Implications, and the Potential Role of Dietary Activators like Resveratrol: Part 1." Alternative Medicine Review **15**(3): 245-263.
- Kiselev, K. V. (2011). "Perspectives for production and application of resveratrol." Applied Microbiology and Biotechnology **90**(2): 417-425.
- Kueck, A., A. W. Pipari, K. A. Griffith, L. Tan, M. Choi, J. Huang, H. Wahl e J. R. Liu (2007). "Resveratrol inhibits glucose metabolism in human ovarian cancer cells." Gynecologic Oncology **107**(3): 450-457.
- Lai, K., L. J. Elsas e K. J. Wierenga (2009). "Galactose Toxicity in Animals." IUBMB Life **61**(11): 1063-1074.
- Leong, C. W., C. H. Wong, S. C. Lao, E. C. Leong, L. F. Lao, P. T. W. Law, K. P. Fung, K. S. Tsang, M. M. Y. Waye, S. K. W. Tsui, Y. T. Wang e S. M. Y. Lee (2007).

- "Effect of resveratrol on proliferation and differentiation of embryonic cardiomyoblasts." Biochemical and Biophysical Research Communications **360**(1): 173-180.
- Levine, B. e J. Y. Yuan (2005). "Autophagy in cell death: an innocent convict?" Journal of Clinical Investigation **115**(10): 2679-2688.
- Li, X. L. e N. Kazgan (2011). "Mammalian Sirtuins and Energy Metabolism." International Journal of Biological Sciences **7**(5): 575-587.
- Lin, Z. X., J. R. S. Hoult e A. Raman (1999). "Sulphorhodamine B assay for measuring proliferation of a pigmented melanocyte cell line and its application to the evaluation of crude drugs used in the treatment of vitiligo." Journal of Ethnopharmacology **66**(2): 141-150.
- Liu, T., P. Y. Liu e G. M. Marshall (2009). "The Critical Role of the Class III Histone Deacetylase SIRT1 in Cancer." Cancer Research **69**(5): 1702-1705.
- Lowe, S. e A. Lin (2000). "Apoptosis in cancer." Carcinogenesis **21**(3): 485-495
- Ma, X. D., X. M. Tian, X. X. Huang, F. Yan e D. F. Qiao (2007). "Resveratrol-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis are associated with Ca<sup>2+</sup> and mCICR-mediated MPT activation in HepG2 cells." Molecular and Cellular Biochemistry **302**(1-2): 99-109.
- Marroquin, L. D., J. Hynes, J. A. Dykens, J. D. Jamieson e Y. Will (2007). "Circumventing the crabtree effect: Replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants." Toxicological Sciences **97**(2): 539-547.
- Mates, J. M., J. A. Segura, J. A. Campos-Sandoval, C. Lobo, L. Alonso, F. J. Alonso e J. Marquez (2009). "Glutamine homeostasis and mitochondrial dynamics." International Journal of Biochemistry & Cell Biology **41**(10): 2051-2061.
- McGuinness, D., D. H. McGuinness, J. A. McCaul e P. G. Shiels (2011). "Sirtuins, bioageing, and cancer." Journal of Aging Research **2011**: 235754.
- Michan, S. e D. Sinclair (2007). "Sirtuins in mammals: insights into their biological function." Biochemical Journal **404**: 1-13.
- Modica-Napolitano, J. S. e K. K. Singh (2002). "Mitochondria as targets for detection and treatment of cancer." Expert Reviews in Molecular Medicine **4**(9): 1-19.
- Moreno-Sanchez, R., S. Rodriguez-Enriquez, A. Marin-Hernandez e E. Saavedra (2007). "Energy metabolism in tumor cells." Febs Journal **274**(6): 1393-1418.

- Mukherjee, S., J. I. Dudley e D. K. Das (2010). "Dose-dependency of Resveratrol in providing health benefits." Dose-Response **8**(4): 478-500.
- Murphy, M. P. e R. A. J. Smith (2000). "Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine." Advanced Drug Delivery Reviews **41**(2): 235-250.
- Ohta, A. e Y. Nishiyama (2011). "Mitochondria and viruses." Mitochondrion **11**(1): 1-12.
- Palacios, O. M., J. J. Carmona, S. Michan, K. Y. Chen, Y. Manabe, J. L. Ward, L. J. Goodyear e Q. Tong (2009). "Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1 alpha in skeletal muscle." Aging-Us **1**(9): 771-783.
- Pallás, M., F. Junyent, E. Verdaguer, C. Beas-Zarate e A. Camins (2010). "Aging control with resveratrol." Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies **7**(3-4): 51-56.
- Patel, K. R., V. A. Brown, D. J. L. Jones, R. G. Britton, D. Hemingway, A. S. Miller, K. P. West, T. D. Booth, M. Perloff, J. A. Crowell, D. E. Brenner, W. P. Steward, A. J. Gescher e K. Brown (2010). "Clinical Pharmacology of Resveratrol and Its Metabolites in Colorectal Cancer Patients." Cancer Research **70**(19): 7392-7399.
- Pelicano, H., D. S. Martin, R. H. Xu e P. Huang (2006). "Glycolysis inhibition for anticancer treatment." Oncogene **25**(34): 4633-4646.
- Pereira, C. V., M. Lebedzinska, M. R. Wieckowski e P. J. Oliveira (2012). "Regulation and protection of mitochondrial physiology by sirtuins." Mitochondrion **12**(1): 66-76.
- Pereira, C. V., A. C. Moreira, S. P. Pereira, N. G. Machado, F. S. Carvalho, V. A. Sardao e P. J. Oliveira (2009). "Investigating drug-induced mitochondrial toxicity: a biosensor to increase drug safety?" Current Drug Safety **4**(1): 34-54.
- Raimundo, N., B. E. Baysal e G. S. Shadel (2011). "Revisiting the TCA cycle: signaling to tumor formation." Trends in Molecular Medicine: 1-9.
- Rajendran, R., R. Garva, M. Krstic-Demonacos e C. Demonacos (2011). "Sirtuins: Molecular Traffic Lights in the Crossroad of Oxidative Stress, Chromatin Remodeling, and Transcription." Journal of Biomedicine and Biotechnology.
- Raju, R., B. Jian, W. Hubbard e I. Chaudry (2011). "The Mitoscriptome in Aging and Disease." Aging Diseases **2**: 174-180.
- Rossignol, R., R. Gilkerson, R. Aggeler, K. Yamagata, S. J. Remington e R. A. Capaldi (2004). "Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells." Cancer Research **64**(3): 985-993.

- Sardao, V. A., P. J. Oliveira, J. Holy, C. R. Oliveira e K. B. Wallace (2009). "Morphological alterations induced by doxorubicin on H9c2 myoblasts: nuclear, mitochondrial, and cytoskeletal targets." Cell Biology and Toxicology **25**(3): 227-243.
- Sareen, D., S. R. Darjatmoko, D. M. Albert e A. S. Polans (2007). "Mitochondria, calcium, and calpain are key mediators of resveratrol-induced apoptosis in breast cancer." Molecular Pharmacology **72**(6): 1466-1475.
- Saunders, L. R. e E. Verdin (2007). "Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging." Oncogene **26**(37): 5489-5504.
- Sauve, A. A., C. Wolberger, V. L. Schramm e J. D. Boeke (2006). The biochemistry of sirtuins. Annual Review of Biochemistry. Palo Alto, Annual Reviews. **75**: 435-465.
- Savouret, J. F. e M. Quesne (2002). "Resveratrol and cancer: a review." Biomedicine & Pharmacotherapy **56**(2): 84-87.
- Scatena, R., P. Bottoni, G. Botta, G. E. Martorana e B. Giardina (2007). "The role of mitochondria in pharmacotoxicology: a reevaluation of an old, newly emerging topic." American Journal of Physiology-Cell Physiology **293**(1): C12-C21.
- Scheffler, I. E. (2001). "Mitochondria make a come back." Advanced Drug Delivery Reviews **49**(1-2): 3-26.
- Sedensky, M. M. e P. G. Morgan (2006). "Mitochondrial respiration and reactive oxygen species in mitochondrial aging mutants." Experimental Gerontology **41**(3): 237-245.
- Smith, J. S., C. B. Brachmann, I. Celic, M. A. Kenna, S. Muhammad, V. J. Starai, J. L. Avalos, J. C. Escalante-Semerena, C. Grubmeyer, C. Wolberger e J. D. Boeke (2000). "A phylogenetically conserved NAD(+)-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(12): 6658-6663.
- Smoliga, J. M., J. A. Baur e H. A. Hausenblas (2011). "Resveratrol and health - A comprehensive review of human clinical trials." Molecular Nutrition & Food Research **55**(8): 1129-1141.
- Stappenbeck, T. S. e H. Miyoshi (2009). "The Role of Stromal Stem Cells in Tissue Regeneration and Wound Repair." Science **324**(5935): 1666-1669.
- Sweetlove, L. J., K. F. M. Beard, A. Nunes-Nesi, A. R. Fernie e R. G. Ratcliffe (2010). "Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle." Trends in Plant Science **15**(8): 462-470.



- Tak, J. K., J. H. Lee e J. W. Park (2012). "Resveratrol and piperine enhance radiosensitivity of tumor cells." Bmb Reports **45**(4): 242-246.
- van Ginkel, P. R., S. R. Darjatmoko, D. Sareen, L. Subramanian, S. Bhattacharya, M. J. Lindstrom, D. M. Albert e A. S. Polans (2008). "Resveratrol inhibits uveal melanoma tumor growth via early mitochondrial dysfunction." Investigative Ophthalmology & Visual Science **49**(4): 1299-1306.
- Vanamala, J., S. Radhakrishnan, L. Reddivari, V. B. Bhat e A. Ptitsyn (2011). "Resveratrol suppresses human colon cancer cell proliferation and induces apoptosis via targeting the pentose phosphate and the talin-FAK signaling pathways-A proteomic approach." Proteome Science **9**.
- Verdin, E., M. D. Hirschey, L. W. S. Finley e M. C. Haigis (2010). "Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling." Trends in Biochemical Sciences **35**(12): 669-675.
- Wang, C. G., L. H. Chen, X. H. Hou, Z. Y. Li, N. Kabra, Y. H. Ma, S. Nemoto, T. Finkel, W. Gu, W. D. Cress e J. D. Chen (2006). "Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage." Nature Cell Biology **8**(9): 1025-U1109.
- Warburg, O. (1930). "Note on the metabolism of tumours." Biochemische Zeitschrift **228**: 257-258.
- Webb, B. A., M. Chimenti, M. P. Jacobson e D. L. Barber (2011). "Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression." Nature reviews. Cancer **11**(9): 671-677.
- Weinberg, F., R. Hamanaka, W. W. Wheaton, S. Weinberg, J. Joseph, M. Lopez, B. Kalyanaraman, G. M. Mutlu, G. R. S. Budinger e N. S. Chandel (2010). "Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**(19): 8788-8793.
- Whyte, L., Y. Y. Huang, K. Torres e R. G. Mehta (2007). "Molecular mechanisms of resveratrol action in lung cancer cells using dual protein and microarray analyses." Cancer Research **67**(24): 12007-12017.
- Yamamoto, H., K. Schoonjans e J. Auwerx (2008). "Sirtuin functions in health and disease (vol 21, pg 1745, 2007)." Molecular Endocrinology **22**(1): 146-146.
- Zick, M., R. Rabl e A. S. Reichert (2009). "Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria." Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research **1793**(1): 5-19.